

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de**  
**los Alimentos**



**ESTUDIO DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE**  
**CEPAS BACTERIANAS DE DISTINTA**  
**PROCEDENCIA.**  
**A STUDY ON THE PROBIOTIC POTENTIAL OF**  
**SELECTED BACTERIAL STRAINS.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Carlos Adam Conte Junior**

**Bajo la dirección de las doctoras**

**Manuela Fernández Álvarez**  
**Eva Hierro Paredes**

**Madrid, 2014**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



ESTUDIO DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE  
CEPAS BACTERIANAS DE DISTINTA  
PROCEDENCIA

A STUDY ON THE PROBIOTIC POTENTIAL OF  
SELECTED BACTERIAL STRAINS

Memoria que para optar al  
título de Doctor por la  
Universidad Complutense de  
Madrid presenta el Licenciado  
Carlos Adam Conte Junior

Madrid, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID

*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología  
de los Alimentos*

Facultad de Veterinaria  
UCM

---

Avda. Puerta de Hierro, s/n. 28040 Madrid  
Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 3743

**MANUELA FERNÁNDEZ ÁLVAREZ Y EVA HIERRO PAREDES, PROFESORAS  
TITULARES DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE  
VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**CERTIFICAN:**

Que la tesis doctoral titulada “Estudio del potencial prebiótico de cepas bacterianas de distinta procedencia”, de la que es autor D. Carlos Adam Conte Junior, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos bajo la dirección conjunta de las abajo firmantes, y cumple las condiciones exigidas para optar el título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 9 de marzo de 2013

Manuela Fernández Álvarez

Eva Hierro Paredes

## ÍNDICE

SUMMARY	I
I. INTRODUCCIÓN	
I.1. LOS ALIMENTOS FUNCIONALES	1
I.2. PROBIÓTICOS	5
I.2.1. Efectos beneficiosos	6
I.2.2. Criterios de selección	9
I.2.2.1. Seguridad	9
I.2.2.2. Aspectos fisiológicos	9
I.2.2.3. Aspectos tecnológicos	10
I.2.3. Productos probióticos comerciales	11
I.2.4. La legislación europea sobre los alimentos funcionales	12
I.2.4.1. Uso de microorganismos probióticos en alimentos	12
I.2.4.2. Declaraciones de salud	14
I.3. COMPUESTOS FUNCIONALES	16
I.3.1. Poliaminas	16
I.3.1.1. Metabolismo de las poliaminas	17
I.3.1.2. Efectos biológicos de las poliaminas	19
I.3.1.2.1. Efectos en la proliferación celular y la apoptosis	19
I.3.1.2.2. Efectos en la maduración intestinal	20
I.3.1.2.3. Efectos en el sistema inmunitario	21
I.3.1.3. Las poliaminas en la dieta	21
I.3.1.4. Aspectos toxicológicos de las aminos presentes en los alimentos	22
I.3.2. Prebióticos	23
I.3.2.1. Efectos biológicos de los oligosacáridos	26

I.3.2.2. Los oligosacáridos en la dieta	27
I.3.3. Ácido linoleico conjugado	28
I.3.3.1. Biosíntesis de CLA	29
I.3.3.2. Efectos biológicos del CLA	30
I.3.3.2.1. Efecto en la salud cardiovascular	30
I.3.3.2.2. Efecto anticarcinogénico	31
I.3.3.2.3. Efecto antioxidante	32
I.3.3.2.4. Efecto en la grasa corporal	32
I.3.3.3. El CLA en la dieta	32
I.3.4. Ácidos grasos de cadena corta	33
I.3.4.1. Efectos biológicos de los AGCC	34
I.3.4.2. Biosíntesis de los AGCC	34
I.3.5. Ácido láctico	35
I.3.5.1. Biosíntesis del ácido láctico	36
I.3.5.2. Efectos biológicos del ácido láctico	37
I.3.5.3. Aspectos toxicológicos del ácido láctico	37
I.3.6. Ácido fólico y otros folatos	38
I.3.6.1. Biosíntesis de folatos	41
I.3.6.2. Los folatos en la dieta	42
I.4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	44
 II. MATERIAL Y MÉTODOS	
II.1. MATERIAL	47
II.1.1. Material biológico	47
II.1.2. Material general de laboratorio	47
II.1.3. Material específico para cromatografía	50
II.1.4. Medios de cultivo	51

II.2. METODOLOGÍA	52
II.2.1. Estudio de la producción de poliaminas y aminos biógenas	52
II.2.1.1. Activación y crecimiento de los cultivos bacterianos	52
II.2.1.2. Extracción de las aminos	52
II.2.1.3. Análisis cromatográfico de las aminos	53
II.2.2. Determinación de la producción de CLA	54
II.2.2.1. Preparación de las muestras	54
II.2.2.2. Extracción de la fracción lipídica	54
II.2.2.3. Metilación ácida	55
II.2.2.4. Análisis cromatográfico de los isómeros de CLA	56
II.2.3. Determinación de la producción de AGCC y ácido láctico	56
II.2.3.1. Estudio del perfil fermentativo	56
II.2.3.2. Producción y cuantificación de ácido láctico	56
II.2.3.3. Producción y cuantificación de los AGCC	57
II.2.3.3.1. Extracción de los AGCC	57
II.2.3.3.2. Análisis cromatográfico de los AGCC	57
II.2.4. Determinación de folatos	58
II.2.4.1. Preparación de las muestras	58
II.2.4.2. Extracción de los folatos	58
II.2.4.3. Desconjugación de los grupos poliglutamilfolato	59
II.2.4.4. Desnaturalización proteica	59
II.2.4.5. Separación de los folatos por cromatografía de afinidad	59
II.2.4.6. Análisis de los folatos por LC-MS/MS	60
II.2.5. Estudio de la producción de oligosacáridos	61
II.2.5.1. Análisis de la fracción de GOS	61
II.2.5.1.1. Evaluación de la actividad $\beta$ -galactosidasa	61
II.2.5.1.2. Producción de GOS por los microorganismos	62

II.2.5.1.3. Análisis de los GOS	62
II.2.5.2. Estudio de la producción de FOS	63
II.2.5.2.1. Evaluación de la actividad fructosiltransferasa	63
II.2.5.2.2. Producción de FOS por los microorganismos	64
II.2.5.2.3. Análisis de los FOS	65
II.2.6. Análisis estadístico	65
 III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
III.1. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE POLIAMINAS Y AMINAS BIÓGENAS	67
III.1.1. Producción de poliaminas	67
III.1.2. Producción de otras aminas	70
III.2. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO	73
III.3. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO Y ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA	78
III.3.1. Producción de ácido láctico	78
III.3.2. Producción de ácidos grasos de cadena corta	86
III.4. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE FOLATOS	94
III.5. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE GALACTOOLIGOSACÁRIDOS Y FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS	106
III.5.1. Evaluación de la actividad $\beta$ -galactosidasa	106
III.5.2. Producción de galactooligosacáridos	109
III.5.3. Evaluación de la actividad fructosiltransferasa	110
III.5.4. Producción de fructooligosacáridos	112
III.6. PRODUCCIÓN GLOBAL DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	113
IV. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	117
V. BIBLIOGRAFÍA	121

## SUMMARY





## Introduction

The current social awareness of the relationship between diet and health has led the food industry to offer to consumers products that may be considered as healthy (Bello, 2006). Beyond their intrinsic nutritional value, functional foods are intended to modulate several physiological functions in order to provide a beneficial effect on health, through the prevention and treatment of certain diseases, such as hypertension, cardiovascular problems, constipation, obesity, cancer, neurological disorders, etc. To produce functional foods, bioactive compounds can be directly added, but functionality can also derive from the activity of probiotic microorganisms.

In the selection process of probiotic microorganisms three basic criteria must be taken into account: safety, functionality and technological characteristics (Saarela et al., 2000). Safety aspects mainly include non-pathogenicity and the lack of antibiotic resistance. Probiotics must not lose viability and functionality or create unpleasant flavours or textures in foods. In relation to functionality, the main aspects that have been traditionally studied are viability and persistence in the gastrointestinal tract, immunomodulation, production of antimicrobial substances, antagonistic and antimutagenic properties. However, other interesting aspect about functionality would be the production of bioactive compounds, such as polyamines, conjugated linoleic acid (CLA), short-chain fatty acids (SCFAs), folates and oligosaccharides. Over the last years, a great number of scientific studies dealing with the functional effects of these substances have been published.

### *Polyamines*

Polyamines, including putrescine, spermidine and spermine, participate in different processes that take place in the gut, such as cell growth and differentiation, glucose transport, motility and regulation of disaccharidase activity. They are also associated with the maturation of the immune system of the gut epithelium and the prevention of food allergy (Kalač and Krausová, 2005). In the eukaryotic cells, the main route for polyamine synthesis is the conversion of arginine in ornithine by arginase, followed by decarboxylation of ornithine to putrescine by ornithine decarboxylase (ODC). Apart from endogenous synthesis,

another possible source of polyamines would be the production by bacteria present in the gut. Bacterial synthesis is more complex since, besides ODC, they possess other decarboxylases which use other intermediary compounds for polyamine production. These enzymes have been characterized in numerous bacteria, such as *Enterococcus* spp. (Leuschner et al., 1999) and *Lactobacillus* spp. (Vassu et al., 2001). Other studies have shown that bacteria present in the distal bowel can also produce polyamines from diet polysaccharides (Santik et al., 1989; Noack et al., 1998).

#### *Conjugated linoleic acid*

The reported beneficial effects of CLA include anticarcinogenesis, antioxidative activity, immunomodulation, antiatherosclerosis and the reduction of body fat (Collomb et al., 2006). CLA is produced from polyunsaturated fatty acids by ruminal bacteria *Butyrivibrio* spp. (Griinari and Bauman, 1999). Other bacteria commonly used in the dairy industry have also been reported to produce CLA from free linoleic acid, i.e. *Propionibacterium freudenreichii*, *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. (Jiang et al., 1998). In this pathway, hydroxyl fatty acids participate as intermediaries, such as ricinoleic acid, which can be used by different lactic acid bacteria to produce significant amounts of CLA (Ando et al., 2003).

#### *Short-chain fatty acids*

The biological effects of SCFAs are mainly related to carbohydrate fermentation in the colon, as a source of these compounds. Butyrate provides energy to colonocytes and it has been studied for its role in the prevention of colon cancer. The balance of acetate:propionate ratio may reduce serum lipids and possibly cardiovascular disease risk. Also, the immunomodulating and anti-inflammatory effects of SCFAs could be related to the relief of the symptoms associated with gastrointestinal disorders (Wong et al., 2006). Most of dietary carbohydrates are fermented in human colon by bacteria yielding SCFAs, although proteins can also be used as substrate (Salyers, 1984). The main SCFAs formed are acetate, propionate and butyrate, although minor amounts of other acids such as valerate, caproate, isobutyrate, etc. are also produced.

In the carbohydrate fermentation, lactic acid is also produced. This

compound contributes to lower the pH of the gut, which inhibits the growth of undesirable bacteria. Most of the lactic acid produced is used by colonic bacteria to generate SCFAs (Bourriaud et al., 2005). On the other hand, D-lactate has been associated to acidosis in humans, especially in infants, but there are a number of scientific studies than question this fact (Connolly and Lönnerdal, 2004).

### *Folates*

Folate is an essential nutrient in the human diet. It has been reported that folate exerts a protective effect against cardiovascular diseases and several types of cancer. Besides, folate deficiency leads to physiological disorders, such as anemia, neural tube defects in newborns and psychiatric syndromes like depression and the decrease of cognitive performance in the elderly (Potier de Courcy, 2006). Folates are synthesized by plants and microorganisms from the combination of three components: a pteridine ring, para-aminobenzoic acid and glutamate. Their production involves the action of six enzymes and, in the last step, polyglutamyl-folates are formed (Sybesma et al., 2003). Lactic acid bacteria are well characterized as folate producers (Lin and Young, 2000).

### *Oligosaccharides*

Oligosaccharides are substrates for beneficial bacteria in the gut, where they stimulate the growth of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp., while inhibiting pathogenic and undesirable bacteria (van den Broek et al., 2008). The majority of the biological effects of oligosaccharides derive from their bacterial fermentation in the colon and the subsequent production of SCFAs.

Galacto-oligosaccharides (GOS) present in human milk offer a strong protection against infections in newborns (Boehm and Stahl, 2007). These compounds are polymers of the type D-glucose- $[\beta$ -D-galactose]<sup>n</sup>, which can also contain N-acetylglucosamine, sialic acid and fucose (Mehra and Kelly, 2006). GOS are synthesized from lactose by galactosyltransferases present in the mammary gland. These enzymes are also present in microorganisms, but bacteria and fungi can also produce GOS through transgalactosylation by  $\beta$ -galactosidases (Rodrigues et al., 2005). This is the case of bifidobacteria and lactic acid bacteria (van den Broek et al., 1999; Splechtna et al., 2006). In fact, commercial GOS are produced by microbial  $\beta$ -galactosidases.

Fructo-oligosaccharides (FOS), such as 1-kestose and nistose are D-fructose polymers synthesized by fructosyltransferases. These enzymes are naturally present in vegetables but they are also found in microorganisms, which generally produce FOS by elongation from sucrose (Heyer and Wendenduerger, 2001).

## **Objectives**

The general purpose of this study was to assess the ability of selected bacterial strains to synthesize bioactive compounds, with the intention of their addition to foods or as a source for their industrial production.

To reach this goal the following partial objectives were approached:

- The evaluation of the enzymatic activities involved in the synthesis of bioactive compounds of interest by selected bacteria.
- The identification and quantification of the bioactive compounds produced in different culture conditions.
- To establish which strains would be further studied for their future use in the food industry.

## **Material and Methods**

### *Analysis of amines*

Nineteen bacterial strains were evaluated. They belonged to the genera *Lactobacillus* (10), *Enterococcus* (5), *Bifidobacterium* (3) y *Staphylococcus* (1). All strains were grown in a decarboxylation broth prepared according to Bover-Cid and Holzapfel (1999). This medium (Table 3, Material and Methods) included 0.25% ornithine monohydrochloride and 0.005% pyridoxal-5-phosphate as a cofactor for decarboxylation reaction. After 4 days at 37 °C under aerobiosis (not for *Bifidobacterium*) and anaerobiosis conditions, amines were extracted, derivatized (Mei, 1994; Bover-Cid and Holzapfel, 1999) and analyzed by HPLC using a UV detector. As internal standard, 1,7-heptanodiamine was added to the samples.

### *Analysis of CLA*

The selected strains were grown in a MRS broth containing 0.02% linoleic

acid as a precursor of CLA, at 37 °C during 24 and 48 h under aerobiosis and anaerobiosis. Intracellular and extracellular production of CLA were evaluated in the pellets and supernatants obtained by centrifugation. The lipid fractions were extracted by the method described by Hanson and Olley (1966). The fatty acid methyl esters were prepared by acid methylation (Chin et al., 1992; Kishino et al., 2002). Samples were analyzed by GC using a FID detector. CLA production was assessed by the analysis of its two main isomers, *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12. Quantification was performed using heptadecanoic acid as an internal standard.

#### *Analysis of lactic acid and SCFAs*

Prior to the quantification of these compounds, the fermentative profile of the selected strains was assessed on API 50 CH strips.

For the analysis of lactic acid, the bacteria were incubated in a sodium bicarbonate buffer added with those sugars which gave the best results in the fermentation study, glucose, fructose, galactose and lactose (Arsène-Ploetze and Bringel, 2004). Incubation was carried out at 37 °C for 24 and 48 h under anaerobiosis. The concentration of L(+)- and D(-)-lactate was determined by an enzymatic kit.

The production of SCFAs was performed in the same medium and conditions described for lactate. Fatty acids were released by acidification and extracted with diethyl ether. Samples were analyzed by GC using a FID detector and quantification was done using crotonic acid as an internal standard.

#### *Analysis of folates*

Bacterial cultures were prepared in MRS broth supplemented with para-aminobenzoic acid as a precursor for folate biosynthesis (Sybesma et al., 2003). Incubation was performed at 37 °C for 24 and 48 h under aerobiosis and anaerobiosis. Intracellular and extracellular extracts were prepared and frozen for further analysis at the *University Medical Center in Vrije Universiteit Amsterdam* (The Netherlands).

For folate extraction, polyglutamyl folate groups were enzymatically deconjugated with carboxypeptidase G (Lin and Young, 2000; Pompei et al., 2007) followed by thermal protein denaturation (Smith et al., 2006). Internal standards

were added to the samples and folates were separated by affinity chromatography in columns packaged with a folate binding protein. Folates were analyzed by LC-MS/MS and quantified by the internal standard method.

#### *Analysis of oligosaccharides*

The production of both galactooligosaccharides (GOS) and fructooligosaccharides (FOS) was evaluated.

Prior to the analysis of GOS, extracellular, intracellular and cell wall-bound  $\beta$ -galactosidase activity was determined using orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranoside as substrate (Nguyen et al., 2006). Then, the strains were activated in MRS broth added with lactose and isopropyl- $\beta$ -D-tiogalactopiranoside to enhance  $\beta$ -D-galactosidase activity (Tryland and Fiksdal, 1998; Leahy et al., 2001). The medium proposed by Hsu et al. (2005) supplemented with 20% lactose (Splechtna et al., 2006) was used for the production of GOS. Incubation was performed at 37 °C for 24 h under anaerobiosis.

Quantification of GOS was done at the facilities of Puleva Biotech (Granada, Spain) by HPLC, using a refractive index detector. In the chromatographic analysis, glucose, galactose and lactose were used as standards, assuming that any compound with a retention time different to them belonged to the GOS fraction (Corral, 2005).

For the analysis of FOS, extracellular, intracellular and cell wall-bound fructosyltransferase activity was first evaluated by the method proposed by Puebla et al. (1999). This method involves a first incubation to promote fructosylsucrose synthesis by fructosyltransferases; in a second step, sucrose is added to the samples to hydrolyze residual sucrose that may interfere with the analysis.

For the production of FOS, strains were activated in modified MRS broth containing different sugars (Stolz et al., 1995). Afterwards, cultures were prepared in MRS broth added with sucrose and fructose, followed by incubation at 37 °C for 24 h under anaerobiosis (Korakli et al., 2003).

As for GOS, FOS were analyzed by HPLC coupled to a refractive index detector at the facilities of Puleva Biotech. Fructose, glucose, sucrose, 1-kestose,

nistose and 1- $\beta$ -fructofuranosyl nistose were used as standards. Quantification was done by the external standard method.

## Results and Discussion

### *Production of amines*

The production of these compounds was markedly influenced by oxygen tension and strain specificity. Thus, lactobacilli strains synthesized more polyamines under anaerobiosis, while the behaviour of enterococci was dependent on the strain. On the other hand, a great variability was found among the strains belonging to the same species; therefore, five strains of *Lactobacillus gasseri* were evaluated and the production of polyamines ranged from 2 to 19 nmol/ml under anaerobiosis. The strain specificity has been previously reported by other authors (Bover-Cid and Holzapfel, 1999; Leuschner et al., 1999). *Enterococcus faecalis* LM24 produced the maximum amount among all the strains tested, with 26 nmol/ml under anaerobiosis. No production was observed in bifidobacteria.

Spermidine was the dominant polyamine that bacteria synthesized, except for *E. faecalis* LM24, which mainly produced spermine. This last fact can be of interest since spermine seems to be the most active polyamine in the control of several physiological processes and it has been reported to exert a more relevant role in the regulation of the ODC than other polyamines (Yuan et al., 2001).

Biogenic amines were also determined due to their health implications. The concentrations of histamine and triptamine detected in this study were very low (< 4.2-5.4 nmol/ml) and would not involve any risk for consumers in the case any of the strains studied if they were added to foods.

### *Production of CLA*

For the rest of analyses only the strains that showed the higher production of polyamines were assayed: 5 *Lactobacillus* sp. and 3 *Enterococcus* sp.

Synthesis of CLA occurred mainly under anaerobiosis. Most of the strains produced CLA, although some of them consumed it. The main isomer produced was *cis*-9, *trans*-11, which is associated with most of the beneficial effects of CLA in the human body (Collomb et al., 2006). For some of the strains, such as *Lactobacillus coryniformis* Q8 and *Enterococcus faecium* LM27, CLA reached the



highest concentration at 24 h incubation, while for other ones, such as *Lactobacillus gasseri* LM21, the highest levels were observed after 48 h. This strain was the major producer (64.0 µg/ml), 95% accounting for intracellular synthesis, although, in relation to extracellular or intracellular production, no clear patterns were defined among strains. Alonso et al. (2003) reported levels between 61 and 132 µg/ml in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*, while Rodríguez-Alcalá et al. (2011) observed considerably lower levels (3.89 and 8.57 µg/ml) for *L. acidophilus*.

Extracellular CLA could be of interest in relation to its synthesis *in situ* by bacteria in the gut (Lee et al., 2007). *E. faecium* LM27 was the main extracellular producer of CLA (37.5 µg/ml). On the other hand, although the main isomer was *cis*-9, *trans*-11, some strains also synthesized noticeable levels of *trans*-10, *cis*-12, which has been associated with the reduction of the body fat and the inhibition of carcinogenesis (Ewaschuk et al., 2006; Park and Pariza, 2007). In the present study, *L. coryniformis* Q8, *L. gasseri* LM21, *L. gasseri* LC9 and *E. faecium* LM27 produced between 11 and 14 µg/ml of this isomer, which are similar to those reported by Alonso et al. (2003).

#### *Production of lactic acid and SCFAs*

In the fermentation assays, lactose, fructose, galactose and glucose were selected as substrates for SCFAs and lactate production. The highest concentrations of lactate were observed after 48 h incubation, with values between 37 and 41 g/l. The lactate yield based on sugars consumed ranged from 0.7 to 0.8 g/g for all the strains. The ratio between isomers is specific of the species of lactic acid bacteria (Connolly and Lönnerdal, 2004). All the lactobacilli strains assayed produced mainly L(+)-lactate (85-98% of the total), except for *L. gasseri* LM21, which yielded around 70% of D(-)-lactate. Enterococci strains also produced L(+)-lactate as the major isomer (77-99%). These observations coincide with those reported by Yun et al. (2003). Since the main isomer was L(+)-lactate, most of the strains would not involve any risk of acidosis in infants although, as previously stated, there are studies that question the toxicity of D(-)-lactate.

In relation to SCFA production, all the strains showed the highest concentrations after 48 h incubation. *E. faecalis* LM24 was the main producer, with

levels higher than 30 mmol/l when lactose was used as substrate. Contrary to lactate synthesis, the type of sugar greatly influenced SCFA production, and significant differences were found among strains. These results are in accordance with those of Macfarlane and Macfarlane (2003). The main SCFAs were acetate and propionate. Enterococci produced more acetate and slightly lower amounts of propionate than lactobacilli, although the acetate concentrations produced by the latter are higher than those reported by other authors (Hove et al., 1994; Commane et al., 2005).

#### *Production of folates*

All the strains produced folates, but the levels were clearly influenced by oxygen tension and incubation time. *L. coryniformis* Q8 and *E. faecalis* LM24 showed the highest values (2067 and 1949 ng/ml, respectively). Enterococci were characterized by an early production under aerobiosis, while after 24 h they began to consume folates. This consumption was not observed under anaerobiosis. On the other hand, lactobacilli generally showed the highest production under anaerobiosis, except for *L. gasseri* LM21, and greater variability was observed in relation to incubation time. Some authors report that lactobacilli are, in general, folate consumers (Crittenden et al., 2003; Sybesma et al., 2003). Therefore, the strains tested in the present study would offer interesting possibilities as a source of folates in probiotic foods.

The total folate levels obtained in this thesis are higher than those reported in the literature, which are usually below 300 ng/ml (Crittenden et al., 2003; Sybesma et al., 2003; Pompei et al., 2007). These differences would be due, in part, to the quantification method. The most widespread technique is a microbiological assay based on the growth of folate-dependent strain, although this method does not allow differentiating each folate derivative. Individual characterization can only be obtained by chromatographic methods. In our study, LC coupled to tandem MS was used, which additionally increases the number of derivatives that can be identified. Thus, eight folates were characterized and quantified.

In relation to the location of folate production, 64-87% of the folate synthesized by enterococci under aerobiosis was intracellular, while under

anaerobiosis the levels were balanced. In general, lactobacilli did not show a clear pattern of intracellular and extracellular production, except for *L. salivarius* HN6 which produced more than 60% of extracellular folate in all the conditions assayed. Extracellular folate production by bacteria would be interesting for direct synthesis and absorption in the large intestine.

Each strain showed a different profile of folate derivatives. For instance, *L. coryniformis* Q8 and *E. faecalis* LM24 were the main producers of 5-methyl-tetrahydrofolate; 10-formyl-tetrahydrofolate was mainly produced by *L. fermentum* LC40 and *L. gasseri* LM21, and this latter strain, together with *L. salivarius* HN6, synthesized the higher amounts of 5,10-methylen-tetrahydrofolate. The species and strain specificity of folate derivative production has also been observed by other authors (Lin and Young, 2000; Sybesma et al., 2003).

#### *Production of oligosaccharides*

All the strains, as a whole, exhibited  $\beta$ -galactosidase activity, which ranged from 1.9 to 2.9 units. The differences observed among strains and incubation conditions could not be considered remarkable.  $\beta$ -galactosidase activity was predominantly intracellular and the values obtained were similar to those reported by Nguyen et al. (2006) and higher than those by Montanari et al. (2000), both in studies on lactobacilli. GOS production was analyzed, under anaerobiosis, in those strains which showed the highest total  $\beta$ -galactosidase activity. *L. salivarius* HN6 exhibited the highest enzymatic activity among all the strains and produced about 14 g/l of GOS after 24 h incubation.

Fructosyltransferase activity is reported to be extracellular or cell wall-bound but the selected strains also showed a significant intracellular activity. In general, production was higher under anaerobiosis. The strains that exhibited the highest activity were *L. salivarius* HN6, *L. gasseri* LM21, *E. faecium* LJx4 and *E. faecalis* LM24. When FOS were analyzed, production was hardly detected. Only *L. gasseri* LM21 synthesizes minimum amounts of 1-kestose and nistose, in comparison to the higher production reported in other microorganisms such as *L. reuteri* (Van Hijum et al., 2002).

Therefore, oligosaccharide production reported in this study was low. In any case, as stated by Gänzle et al. (2009), it is not likely that the use of lactic acid

bacteria to produce these compounds could replace the industrial processes currently used to obtain prebiotics. However, the use of enzymes from these bacteria, even in low amounts, would allow the synthesis of those oligosaccharides that are more adequate for the growth of the gut microbiota (Tzortzis et al., 2005; Splechtna et al., 2007). Furthermore, these enzymes could be expressed in other microorganisms (Corral, 2005), and also crude extracts from lactic acid bacteria could be used for the *in situ* production of oligosaccharides in foods (Vasiljevic and Jelen, 2003).

## Conclusion

On the basis of the global production of bioactive compounds, *L. salivarius* HN6 and *E. faecalis* LM24 strains are proposed for further studies aimed to assess their technological utility. *L. gasseri* LM21 and *L. coryniformis* Q8 would be of interest for the specific production of conjugated linoleic acid and folates, respectively.

## References

- Alonso, L., Cuesta, E.P. and Gilliland, S.E. (2003). Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. *J. Dairy Sci.* 86: 1941-1946.
- Ando, A., Ogawa, J., Kishino, S. and Shimizu, S. (2003). CLA production from ricinoleic acid by lactic acid bacteria. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80: 889-894.
- Arsène-Ploetze, F. and Bringel, F. (2004). Role of inorganic carbon in lactic acid bacteria metabolism. *Lait* 84: 49-59.
- Bello, J. (2006). La ciencia de los alimentos saludables: una panorámica actual. *Ars Pharm.* 47: 137-171.
- Boehm, G. and Stahl, B. (2007). Oligosaccharides from milk. *J. Nutr.* 137: 847-849.
- Bourriaud, C., Robins, R.J., Martin, L., Kozlowski, F., Tenailleau, E., Cherbut, C. and Michel, C. (2005). Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *J. Appl. Microbiol.* 99: 201-212.
- Bover-Cid, S. and Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53: 33-41.
- Collomb, M., Schmid, A., Sieber, R., Wechslera, D. and Ryhanen, E.L. (2006). Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *Int. Dairy J.* 16: 1347-1361.
- Commane, D.M., Shortt, C.T., Silvi, S., Cresci, A., Hughes R.M. and Rowland, I.R. (2005). Effects of fermentation products of pro- and prebiotics on trans-epithelial electrical resistance in an *in vitro* model of the colon. *Nutr. Cancer* 51: 102-109.
- Connolly, E. and Lönnerdal, B. (2004). D(-)-lactic acid-producing bacteria safe to use in infant formulas. *NUTRAfoods* 3: 37-49.
- Corral, J.M. (2005). Clonación, expresión y evolución dirigida de beta-galactosidasas de procariotas. Tesis

- Doctoral. Universidad de Granada.
- Crittenden, R.G., Martinez, N.R. and Playne, M.J. (2003). Synthesis and utilization of folate by yogurt starter cultures and probiotic bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 217-222.
- Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L. and Pariza, M.W. (1992). Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Comp. Anal.* 5: 185-97.
- Ewaschuk, J.B., Walker, J.W., Diaz, H. and Madsen, K.L. (2006). Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs *in vitro* and *in vivo* in mice. *J. Nutr.* 136: 1483-1488.
- Gänzle, M.G., Zhang, C., Monang, B.S., Lee, V. and Schwab, C. (2009). Novel metabolites from cereal-associated lactobacilli – Novel functionalities for cereal products? *Food Microbiol.* 26: 712-719.
- Griinari, J.M. and Bauman, D.E. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. En *Advances in conjugated linoleic acid research*. Yurawez P., Mossoba M.M., Kramer J.K.G., Nelson G. and Pariza M.W. (eds.). American Oil Chemists Society, AOCS Press, Champaign, vol. 1, pp. 180–200.
- Hanson, S.W.F. and Olley, J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenate. *Biochem. J.* 89: 101-102.
- Heyer, A.G. and Wendenduerger, R. (2001). Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowii* IAM 2544. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 363-370.
- Hove, H., Nordgaard-Andersen, I. and Mortensen, P.B. (1994). Effect of lactic acid bacteria on the intestinal production of lactate and short-chain fatty acids, and the absorption of lactose. *Am. J. Clin. Nutr.* 59: 74-79.
- Hsu, C.A., Yu, R.C. and Chou, C.C. (2005). Production of  $\beta$ -galactosidase by bifidobacteria as influenced by various culture conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 197-206.
- Jiang, J., Björck, L. and Fonden, R. (1998). Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J. Appl. Microbiol.* 85: 95-102.
- Kalač, P. and Krausová, P. (2005). A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chem.* 90: 219-230.
- Kishino, S., Ogawa, J., Omura, Y., Matsumura, K. and Shimizu, S. (2002). Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *JAOCs* 79: 159-163.
- Korakli, M., Pavlovic, M., Ganzle, M.G. and Vogel, R.F. (2003). Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2073-2079.
- Leuschner, R.G.K., Kurihara, R. and Hammes, W. P. (1999). Formation of biogenic amines by proteolytic enterococci during cheese ripening. *J. Sci. Food Agric.* 79: 1141-1144.
- Lin, M.Y. and Young, C.M. (2000). Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 10: 409-413.
- Mehra, R. and Kelly, P. (2006). Milk oligosaccharides: Structural and technological aspects. *Int. Dairy J.* 16: 1334-1340.
- Mei, Y.H. (1994). A sensitive and fast method for the determination of polyamines in biological samples. Benzoyl chloride pre-column derivatization high-performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 17: 2413-2418.
- Montanari, G., Zambonelli, C., Grazia, L., Benevelli, M. and Chiavari, C. (2000). Release of  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacilli*. *Food Technol. Biotechnol.* 38: 129-133.
- Nguyen, T.H., Splechtna, B., Steinbock,

- M., Kneifel, W., Lettner, H.P., Kulbe, K.D. and Haltrich, D. (2006). Purification and characterization of two novel  $\beta$ -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 4989-4998.
- Noack, J., Klessen, B., Proll, J., Dongowski, G. and Blaut, M. (1998). Dietary guar gum and pectin stimulate intestinal microbial polyamine synthesis in rats. *J. Nutr.* 128: 1385-1391.
- Park, Y. and Pariza, M.W. (2007). Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). *Food Res. Int.* 40: 311-323.
- Pompei, A., Cordisco, L., Amaretti, A., Zaroni, S., Matteuzzi, D. and Rossi, M. (2007). Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 179-185.
- Potier de Courci, G. (2006). Le point sur le rôle des folates. Le point sur le rôle des folates. *Sci. Aliment.* 26: 363-376.
- Puebla, A.F., Battaglia, M.E., Salerno, G.L. and Pontis, H.G. (1999). Sucrose-sucrose fructosyl transferase activity: a direct and rapid colorimetric procedure for the assay in plant extracts. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 699-702.
- Rodrigues, L., Rocha, I. and Torres, D. (2005). Alimentos funcionais - uma área estratégica para a BIOTEMPO. *Bol. Biotechnol.* 82: 3-12.
- Rodríguez-Alcalá, L.M., Braga, T., Malcata, F.X., Gomes, A. and Fontecha, J. (2011). Quantitative and qualitative determination of CLA produced by *Bifidobacterium* and lactic acid bacteria by combining spectrophotometric and Ag+-HPLC techniques. *Food Chem.* 125: 1373-1378.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Matto, J. and Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84: 197-215.
- Salyers, A.A. (1984). *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* 38: 293-313.
- Santik, H.P., Hessels, J., Kingma, A.W., VandenBerg, G.A., Muskiet, F.A. and Halie, M.R. (1989). Microbial influences on urinary polyamines excretion. *Clin. Chim. Acta* 179: 305-314.
- Smith, D.E., Kok, R.M., Teerlink, T., Jakobs, C. and Smulders, Y.M. (2006). Quantitative determination of erythrocyte folate vitamers distribution by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44: 450-459.
- Splechtna, B., Nguyen, T.H., Steinböck, M., Kulbe, K. D., Lorenz, W. and Haltrich, D. (2006). Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose using beta-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 4999-5006.
- Splechtna, B., Nguyen, T.H., Zehetner, R., Lettner, H.P., Lorenz, W. and Haltrich, D. (2007). Process development for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus* spp. *Biotechnol. J.* 2: 480-485.
- Stolz, P., Vogel, R.F. and Hammes, W.P. (1995). Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 201: 402-410.
- Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, M.H.N. and Hugenholtz, J. (2003). Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4542-4548.
- Tryland, I. and Fiksdal, L. (1998). Enzyme characteristics of  $\beta$ -D-galactosidase- and  $\beta$ -D-glucuronidase-positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1018-1023.
- Tzortzis, G., Goulas, A. and Gibson, G.

- G.R. (2005). Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 412-416.
- van den Broek, L.A.M., Hinz, S.W.A., Beldman, G., Vincken, J.P. and Voragen, A. G.J. (2008). Bifidobacterium carbohydrases – their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. *Mol. Nutr. Food Res.* 52: 146-163.
- van den Broek, L.A.M., Ton, J., Verdoes, J.C., Van Laere, K.M.J., Voragen, A.G.J. and Beldman, G. (1999). Synthesis of  $\beta$ -galactooligosaccharides by a cloned  $\beta$ -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis*. *Biotechnol. Lett.* 21: 441-445.
- Van Hijum, S.A.F.T., van Geel-Schutten, G.H., Rahaoui, H., Van der Maarel, M.J.E.C. and Dijkhuizen, L. (2002). Characterisation of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4390-4398.
- Vasiljevic, T. and Jelen, P. (2003). Oligosaccharide production and proteolysis during lactose-hydrolysis using crude cellular extracts from lactic acid bacteria. *Lait* 83: 453-467.
- Vassu, T., Smarandache, D., Stoica, I., Sasarman, E., Fologea, D., Musat, F., Csutak, O., Nohit, A.M., Iftime, O. and Gherasim, R. (2001). Biochemical and genetic characterization of *Lactobacillus plantarum* CMGB-1 strain used as probiotic. *Roum. Biotechnol. Lett.* 7: 585-598.
- Wong, J.M., de Souza, R., Kendall, C.W., Emam, A. and Jenkins, D.J. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Gastroenterol.* 40: 235-243.
- Yuan, Q., Ray, R.M., Viar, M.J. and Johnson, L.R. (2001). Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its antizyme in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280: 130-138.
- Yun, J.S., Wee, Y.J. and Ryu, H.W. (2003). Production of optically pure L(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enz. Microbial Technol.* 33: 416-423.

# INTRODUCCIÓN





## I.1. LOS ALIMENTOS FUNCIONALES

Actualmente en los países desarrollados nos encontramos en la llamada “era de los alimentos funcionales”. El concepto de “alimento funcional” se planteó por primera vez en Japón a mediados de la década de 1980. La elevada esperanza de vida, con el consiguiente envejecimiento de la población, impulsó estos alimentos como forma de prevención de las enfermedades crónicas y degenerativas (Arai, 1993).

Aunque se han propuesto diversas definiciones al respecto, podríamos decir que “un alimento puede ser considerado como funcional si se demuestra que afecta beneficiosamente a una o más funciones del organismo, más allá de su adecuado efecto nutricional, en el sentido de una mejora del estado de salud y bienestar, o una reducción del riesgo de padecer enfermedades. Además, se deben haber demostrado estos efectos en las cantidades en las que normalmente se consume en la dieta” (Diplock y col., 1999). Entre las posibilidades existentes, un alimento funcional podría ser un alimento natural, un alimento al que se le ha añadido o eliminado algún componente, un alimento al que se le ha modificado la naturaleza o la biodisponibilidad de alguno de sus componentes, o al que se han añadido microorganismos con efecto beneficioso para la salud (Stanton y col., 2005; Bello, 2006).

Gran parte de los alimentos funcionales disponibles en el mercado se elaboran mediante la adición de distintos ingredientes. A continuación se exponen brevemente los de mayor interés. En apartados posteriores se estudiarán más en detalle los que constituyen el objetivo de este trabajo.

Los microorganismos *probióticos* son, con diferencia, el segmento más dinámico y con mayor importancia económica dentro de los alimentos funcionales. El gran interés actual por estos microorganismos está relacionado con el importante papel que desempeña la microbiota intestinal en la salud humana, como barrera frente a microorganismos patógenos (Collado y col., 2007), como agentes moduladores del sistema inmunitario (Corthésy y col., 2007) y también porque facilitan la digestión de la lactosa (Marteau y col., 1997; Levri y col., 2005), entre otros efectos.

Por otra parte, la incorporación en la dieta de sustancias *prebióticas* es una estrategia que permite aumentar el número de microorganismos intestinales beneficiosos para la salud. Aunque algunos péptidos, proteínas y ciertos lípidos pueden ser considerados prebióticos, la mayoría de ellos son carbohidratos no digeribles que incluyen desde disacáridos hasta oligosacáridos y polisacáridos. Los más estudiados son la inulina y la oligofructosa, que se añaden a los alimentos como sustitutos de grasa y para favorecer el desarrollo de una adecuada microbiota intestinal (Guarner y Malagelada, 2003; Roller y col., 2004).

La *fibra dietética* es el conjunto de sustancias de origen vegetal, en su mayor parte hidratos de carbono, que no pueden ser digeridas por las enzimas del tracto digestivo humano, pero sí parcialmente fermentadas por las bacterias del colon (Zarzuelo-Zurita, 2001). Celulosa, algunas fracciones de hemicelulosa, lignina y almidón resistente constituyen la denominada fibra insoluble, mientras que la fibra soluble está representada fundamentalmente por pectinas, gomas, mucílagos y algunas fracciones de hemicelulosa. Los efectos funcionales que se atribuyen a la fibra son, principalmente, un aumento del volumen fecal y el estímulo de la motilidad intestinal (Tomlin y Read, 1988; Moreno, 2000), una mayor sensación de saciedad (Delargy y col., 1997; Howarth y col., 2001), la reducción de los niveles de colesterol sanguíneo (Moreno, 2000) y la prevención de ciertos tipos de cáncer (Ferguson y col., 2001).

Hoy en día, no hay duda de que la modificación de ciertos patrones alimentarios es un arma imprescindible para hacer frente a las enfermedades cardiovasculares en los países desarrollados. Entre las posibles estrategias se encuentra la ingestión de menos cantidad de *grasa* que, por otra parte, sea cualitativamente más saludable. Está demostrado que el consumo elevado de grasas saturadas y parcialmente hidrogenadas tipo *trans* es perjudicial para el sistema cardiovascular (Lichtenstein, 1997), mientras que una ingesta elevada de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados de la serie n-3 disminuye significativamente el riesgo de padecer este tipo de enfermedades (Sánchez-Muñiz, 2002).

El ácido oleico (C18:1 n-9) es el principal representante de los ácidos grasos monoinsaturados y sus efectos beneficiosos sobre la función cardiovascular son bien conocidos. Del ácido oleico se derivan eicosanoides con

actividad vasodilatadora y antiagregante (Massaro y col., 1999). A nivel del perfil lipídico sanguíneo, este ácido origina una disminución de los niveles de triglicéridos, colesterol total y lipoproteínas de baja densidad (LDL), así como una menor oxidación de las mismas, mientras que eleva la concentración de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), consideradas antiaterogénicas (Mataix, 2009).

Por su parte, los ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3 también desempeñan un papel relevante como agentes antiinflamatorios, antiaritmogénicos y protectores frente a la enfermedad cardiovascular (Kang y Leaf, 2000; Mataix-Verdú y col., 2001). El principal representante de la familia n-3 es el ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3 n-3), precursor de los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), mientras que de la serie n-6 lo es el ácido linoleico (C18:2 n-6), precursor del ácido araquidónico (AA). Los ácidos grasos de ambas series dan lugar a compuestos con distinta actividad sobre el sistema cardiovascular y por eso es tan importante un equilibrio en su ingesta.

Existen distintas recomendaciones para mejorar la calidad nutricional de la fracción lipídica de la dieta. Así, la *American Heart Association* (2006) recomienda que el consumo diario de grasa saturada y *trans* no sea superior al 7% y 1% de la energía total, respectivamente, y que la ingesta de colesterol sea inferior a 300 mg/día. Por su parte, la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria señala que para asegurar una adecuada presencia en la dieta de ácidos grasos n-3, y teniendo en cuenta la competencia enzimática entre las distintas series de ácidos grasos, se puede recomendar una relación n-6/n-3 de 6/1 a 10/1 (Ros, 2001). En la actualidad se estima que en los países occidentales esta relación se sitúa en torno a 15-16,7/1 (Simopoulos, 2004).

Entre los componentes con efectos saludables que presentan los vegetales se encuentran los llamados *compuestos fitoquímicos*, denominación que incluye a fitoesteroles, fitoestrogénos y antioxidantes fenólicos.

Los fitosteroles son moléculas esteroideas similares al colesterol que se encuentran principalmente en los aceites vegetales. Debido a su similitud estructural, compiten con el colesterol por su transporte a través de la mucosa intestinal, reduciendo así los niveles séricos de LDL (Heinemann y col., 1991).

Los fitoestrógenos son compuestos estructurales o funcionalmente similares a los estrógenos, por lo que se comportan como agonistas parciales de sus receptores ejerciendo acciones beneficiosas en los órganos y tejidos que los expresan, como la prevención y control de la osteoporosis (Messina, 1999), la disminución de la incidencia del cáncer de mama y próstata (Messina y col., 1994), la mejora de los síntomas asociados a la menopausia (Messina y Hughes, 2003) y la prevención de las enfermedades cardiovasculares (Lichtenstein, 1998). Hay una amplia variedad de fitoestrógenos, pero quizá entre los más interesantes se encuentren las isoflavonas, cuya principal fuente son las leguminosas, en especial la soja.

La actividad antioxidante es uno de los mecanismos más importantes para la prevención de enfermedades como el cáncer, las patologías cardiovasculares y enfermedades degenerativas relacionadas con la edad, como las cataratas y las disfunciones cognitivas (Mazza, 2000; Nijveldt y col., 2001). En los vegetales se encuentran numerosos antioxidantes fenólicos pertenecientes en su mayoría al grupo de compuestos conocidos como flavonoides, de los que se han identificado más de 5.000, entre los que se encuentran flavonas, flavanonas, catequinas y antocianinas.

*Vitaminas y minerales* son micronutrientes esenciales que no aportan energía, pero sin ellos el organismo no es capaz de aprovechar los nutrientes plásticos y energéticos que proporciona la dieta. Participan en multitud de procesos en el organismo y son los únicos compuestos funcionales que poseen recomendaciones claras en cuanto a requerimientos mínimos por parte de la mayoría de las autoridades sanitarias (Ardeshirpour y col., 2007; Velicer y Ulrich, 2008). Una dieta equilibrada y rica en productos frescos y naturales suministra todas las vitaminas y minerales necesarios para un correcto funcionamiento del organismo, no siendo necesario su aporte suplementario (Kaplan y col., 2007). Sin embargo, en determinadas etapas de la vida, como la lactancia, el embarazo o durante la tercera edad, o como consecuencia de cierta actividad física (como en el caso de los deportistas), puede ser necesario aumentar la ingesta para prevenir deficiencias (Huang y col., 2006; McKenna y McIntyre, 2006; Huskisson y col., 2007).

## I.2. PROBIÓTICOS

Desde que Metchnikoff (1907) postuló que las bacterias participantes en la fermentación del yogur contribuían al mantenimiento de la salud porque “suprimían las fermentaciones de tipo putrefactivo” de la microbiota intestinal, son numerosos los estudios que han intentado establecer la relación entre la ingesta de ciertos microorganismos y la protección frente a enfermedades. Esto ha conducido en la actualidad al desarrollo de multitud de nuevos alimentos funcionales.

Posiblemente fue Vergio (1954) el primero que utilizó el término “probiótico”. Esta palabra, de origen griego (*probiotika*), significa “para la vida” y Vergio la empleó para comparar los efectos adversos (*antibiotika*) que los antibióticos ejercían sobre la microbiota intestinal con los efectos beneficiosos que ejercían otros factores que no pudo determinar. Unos años más tarde, Lilly y Stilwell (1965) relacionaron estos efectos probióticos con microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos. Desde entonces, la definición de “probiótico” ha sido un tema controvertido, ya que entre otros aspectos se ha discutido si sólo se pueden considerar probióticos los microorganismos o también sus metabolitos, o si sólo se tienen en cuenta los efectos sobre la microbiota intestinal, o también las acciones sobre otras comunidades microbianas en otros puntos del organismo. En este sentido, la FAO/OMS define los probióticos como “organismos vivos que ingeridos a dosis definidas ejercen efectos beneficiosos para la salud” (FAO/OMS, 2006), aunque paralelamente han surgido otras definiciones que también incluyen dentro de este término a microorganismos inactivados o algunos de sus componentes celulares (Ouwehand y Salminen, 1998; Isolauri y col., 2002).

Existe en el campo de los alimentos funcionales una estrecha relación entre probióticos y prebióticos. Gibson y Roberfroid (1995) introdujeron este último término para referirse a los ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan beneficiosamente al hospedador por una estimulación selectiva del crecimiento o de la actividad de los microorganismos del colon. Esta selectividad fue demostrada para el género *Bifidobacterium*, que puede ser estimulado por la ingestión de sustancias tales como los fructooligosacáridos (Scherezenmeir y De Vrese, 2001). Igual que ocurre con los probióticos, el consumo regular de

prebióticos es determinante para lograr un efecto beneficioso. La última generación de alimentos funcionales combina microorganismos probióticos y sustratos prebióticos, dando lugar a los llamados productos “simbióticos”.

La mayoría de los microorganismos asociados con actividades probióticas son bacterias lácticas y bifidobacterias. No obstante, también se utilizan con este fin algunas cepas de otras especies bacterianas como *Escherichia coli* y *Bacillus cereus* y algunas levaduras como *Saccharomyces boulardii* y *Saccharomyces cerevisiae* (Guarner y Schaafsma, 1998; Mercenier y col., 2002).

### **I.2.1. Efectos beneficiosos**

Los probióticos pueden ejercer sus efectos beneficiosos bien directamente mediante la interacción de los microorganismos vivos con el hospedador, o bien indirectamente como resultado de la ingestión de metabolitos microbianos (Stanton y col., 2005). Los mecanismos de acción son múltiples y cada microorganismo y cepa puede tener funciones específicas (Guarner y Malagelada, 2003; Salminen y col., 2005).

En la Tabla 1 se resumen los principales microorganismos probióticos y sus efectos más relevantes.

El íleon terminal y el colon parecen ser el sitio de preferencia para la colonización intestinal de lactobacilos y bifidobacterias, respectivamente (Charteris y col., 1998; Bielecka y col., 2002). Mediante un mecanismo denominado exclusión competitiva, los microorganismos probióticos permiten modular la microbiota intestinal impidiendo la colonización de la mucosa por microorganismos potencialmente patógenos, a través de la competición por sitios de adhesión y por nutrientes y/o mediante la producción de compuestos antimicrobianos (Kaur y col., 2002; Guarner y Malagelada, 2003). Está comprobado que es posible aumentar el número de microorganismos beneficiosos en el tracto gastrointestinal mediante la inclusión en la dieta de probióticos o prebióticos (Crittenden, 1999; Gibson y Fuller, 2000).

Tabla 1. Probióticos con efectos beneficiosos sobre la salud, demostrados mediante ensayos clínicos en humanos.

Microorganismos probióticos	Efectos beneficiosos	Referencias
<i>Bifidobacterium lactis</i> BB12	Tratamiento de la alergia	Isolauri y col. (2001)
	Reducción de la diarrea por rotavirus	Saavedra y col. (1994)
	Reducción de la incidencia de la diarrea del viajero	Black y col. (1989)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La5	Reducción de la diarrea asociada con antibióticos	Black y col. (1991)
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Reducción de la diarrea por rotavirus	Sugita y Togawa (1994)
	Inmunomodulación	Nagao y col. (2000)
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1	Reducción de la colonización por <i>Helicobacter pylori</i>	Felley y col. (2001)
<i>Lactobacillus paracasei</i> 33	Prevención de rinitis alérgica	Wang y col. (2004)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	Reducción de los síntomas de colon irritable	Niedzielin y col. (2001)
	Reducción de enterocolitis recurrente por <i>Clostridium difficile</i>	Wullt y col. (2003)
	Reducción de los niveles de colesterol LDL	Bukowska y col. (1998)
<i>Lactobacillus reuteri</i> SD2112	Reducción de la diarrea por rotavirus	Shornikova y col. (1997)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Reducción de la diarrea por rotavirus	Guandalini y col. (2000)
	Inmunomodulación	Kaila y col. (1992)
	Reducción de la inflamación por colon irritable	Gupta y col. (2000)
	Tratamiento y prevención de alergias	Kalliomaki y col. (2001); Majamaa e Isolauri (1997)
<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	Reducción de los síntomas de colon irritable	Mattila-Sandholm y col. (1999)
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Reducción de la incidencia de colon irritable	Guslandi y col. (2000)



Los microorganismos probióticos también parecen influir en la biodisponibilidad y digestibilidad de lípidos y proteínas, gracias a la liberación de diversas enzimas en el lumen intestinal (Kopp-Hoolihan, 2001). Además, estos microorganismos pueden aumentar la concentración de algunos nutrientes, entre los que cabe citar vitaminas del complejo B, ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta, tanto en los alimentos como en el propio intestino (Rolfe, 2000).

Algunos estudios clínicos sugieren que ciertos probióticos reducen la incidencia y duración de los procesos diarreicos de diverso origen (Guandalini y col., 2000; Meier y col., 2003). Asimismo, se está estudiando el papel de los probióticos como adyuvantes en el tratamiento y/o prevención de diversas enfermedades inflamatorias crónicas cuya etiología no está clara, como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn o el síndrome del colon irritable (Nobaek y col., 2000; Niedzielin y col., 2001). Por otra parte, aunque los resultados de las experiencias clínicas son contradictorios, estudios *in vitro* muestran que distintas cepas de lactobacilos atenúan el crecimiento de *Helicobacter pylori* y la adhesión de este microorganismo a la mucosa gástrica (Chatterjee y col., 2003; Ushiyama y col., 2003).

Los tan aclamados efectos inmunoestimulantes de los probióticos aún no están completamente aclarados (Cross, 2002; Kimura y col., 2006). Dichos efectos podrían estar relacionados con la capacidad de interacción con las placas de Peyer y las células epiteliales intestinales, estimulando la secreción de IgAs y la migración de células T en el intestino (Perdigón y Holgado, 2000). Además, los probióticos tendrían un papel mediador en el mantenimiento de un equilibrio entre citoquinas pro y antiinflamatorias (Isolauri y col., 2001).

Finalmente, en relación con otros posibles efectos beneficiosos, se están realizando estudios tanto *in vitro* como clínicos sobre el papel de los probióticos en la prevención de ciertos tipos de cáncer de colon (Greenwald y col., 2001; Van Loo y col., 2005; Santosa y col., 2006), así como en el tratamiento de diversas patologías como la hipertensión (Seppo y col., 2003), encefalopatía hepática (Solga, 2003; Bongaerts y col., 2005), pancreatitis (Olah y col., 2002; Kecskes y col., 2003), otitis (Rooss y col., 2001) y desórdenes atópicos (Matricardi y col., 2003; Lodinova-Zadnikova y col., 2003).

## **I.2.2. Criterios de selección**

Para que una cepa pueda desarrollar su potencial probiótico, además de demostrar sus efectos beneficiosos y ser segura para el consumidor, debe ser ingerida en cantidad suficiente (lo que implica que debe ser compatible con los procesos tecnológicos de producción), ser capaz de sobrevivir al tránsito por el tracto gastrointestinal y colonizar la mucosa intestinal.

### ***I.2.2.1. Seguridad***

La mayoría de las cepas utilizadas como probióticos son comensales en el organismo humano o han sido utilizadas tradicionalmente en la elaboración de distintos alimentos. Estos aspectos garantizarían a priori su inocuidad, aunque antes de su aplicación comercial deben descartarse efectos negativos y, por ello, se recomienda que sean sometidas a distintas pruebas de caracterización que incluirían la resistencia a antibióticos, el intercambio de material genético, la presencia de factores de virulencia, el potencial invasivo, la caracterización de actividades metabólicas nocivas, la implicación en infecciones sistémicas o la estimulación excesiva del sistema inmunitario.

### ***I.2.2.2. Aspectos fisiológicos***

Estos aspectos se refieren a la capacidad de una cepa probiótica para alcanzar y/o colonizar la mucosa intestinal.

Para que los probióticos desarrollen sus efectos biológicos es necesario que permanezcan viables durante su paso por el tracto gastrointestinal y que alcancen el intestino en niveles de  $10^9$  microorganismos/día (Berrada y col., 1991). La resistencia al pH ácido del estómago y a las sales biliares es específica de cada cepa (Zavaglia y col., 1998; Charteris y col., 1998). Sin embargo, no hay que olvidar que un factor que contribuye a la supervivencia de los probióticos es la matriz en la que se vehiculan y así, la leche y sus derivados ejercen un efecto protector frente a las condiciones del tracto gastrointestinal, aumentando la posibilidad de que estos microorganismos permanezcan viables durante su tránsito (Charteris y col., 1998; Gardiner y col., 2005).

Una vez en el intestino, para llevar a cabo una colonización efectiva es esencial la capacidad de adhesión de la cepa a las células epiteliales de la

mucosa o a la capa de mucus (Merk y col., 2005). Los microorganismos que peor se adhieren tienen menos posibilidades de mostrar sus efectos metabólicos y de inmunomodulación y menos capacidad para competir con las bacterias enteropatógenas (Mack y col., 1999; Saarela y col., 2000).

La supervivencia y multiplicación de los microorganismos probióticos en el intestino se debe, entre otros factores, al establecimiento de relaciones de competencia por los nutrientes (Hooper y col., 1999) y a la producción de compuestos con actividad antimicrobiana. Entre los compuestos antimicrobianos se encuentran distintos ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y reuterina (de Vuyst y col., 2004).

### ***1.2.2.3. Aspectos tecnológicos***

La utilización de cepas probióticas en los alimentos requiere también que sean adecuadas desde el punto de vista tecnológico, es decir, que no afecten negativamente a las propiedades organolépticas y que además se mantengan viables durante el procesado, almacenamiento y distribución del producto.

Entre los factores que influyen en la viabilidad de estos microorganismos en los alimentos cabe citar la concentración del inóculo, la disponibilidad de nutrientes, la tensión de oxígeno, el pH y las interacciones con los cultivos iniciadores.

Se recomienda que los probióticos estén presentes en productos lácteos fermentados en una concentración mínima de  $10^8$  ufc/ml (Shortt, 1999). En Japón, la *Fermented Milks and Lactic Acid Bacteria Beverages Association* establece un mínimo de  $10^7$  ufc viables/ml en los productos lácteos (Tamime y col., 2005). Es deseable que las cepas probióticas sean apropiadas para la producción industrial a gran escala y que resistan la congelación o liofilización, que son las formas habituales de distribución de estos microorganismos.

La adición al medio de hidrolizados proteicos, azúcares y vitaminas potencia el crecimiento de los microorganismos probióticos (Lucas y col., 2004; Desai y col., 2004). Por otra parte, las bifidobacterias son capaces de utilizar para su crecimiento lactulosa y oligosacáridos, por lo que estos compuestos se

incluyen de forma habitual en los alimentos a los que se incorporan estos microorganismos.

Es deseable la selección de cepas tolerantes al oxígeno, pero en el caso de las bifidobacterias, que son anaerobias estrictas, se puede recurrir a operaciones de desaireación (Klaver y col., 1993) y al empleo de envases con elevadas propiedades de barrera (Tamime y col., 2005).

La presencia de cultivos iniciadores en alimentos fermentados puede afectar a la supervivencia de los probióticos mediante la producción de inhibidores como ácidos, peróxido de hidrógeno y otros compuestos. Para solventar esto se puede optar, bien por añadir los probióticos una vez concluida la fermentación o mediante la realización de una fermentación en dos fases, una primera a cargo de las bacterias probióticas, seguida de la adición de los cultivos iniciadores (Tamime y col., 2005). En ocasiones se recurre a la microencapsulación para proteger a los microorganismos frente a distintas condiciones del procesado, como la elevada acidez, la congelación, la presencia de oxígeno (Tamime y col., 2005; Krasaekoopt y col., 2003).

Por lo que se refiere a la compatibilidad de las cepas probióticas con las propiedades organolépticas del producto, aunque es deseable que estas cepas presenten cierta actividad proteolítica y lipolítica, ello puede tener cierta repercusión en el sabor y aroma (Fox y col., 1993; Kunji y col., 1996). Adicionalmente, las bifidobacterias producen ácido acético durante la fermentación, lo que puede influir negativamente en la aceptabilidad del producto (Hoier, 1992).

### **1.2.3. Productos probióticos comerciales**

Existe en la actualidad una amplia gama de productos probióticos en el mercado. Las leches fermentadas, en particular, resultan muy adecuadas para la adición de microorganismos, ya que tradicionalmente incluyen bacterias y levaduras a las que se han atribuido funciones fisiológicas favorables. En los últimos tiempos, el gran interés que ha suscitado la elaboración de productos lácteos fermentados adicionados de probióticos y/o prebióticos ha dado lugar al desarrollo de una amplia gama de productos y a una tendencia creciente en el

consumo de leches fermentadas a escala mundial (Oberman y Libudzisz, 1998; Stanton y col., 2003; Saad, 2006).

El primer producto lácteo probiótico comercial fue una leche fermentada y se lanzó al mercado en Japón en la década de 1950, el *Yakult*, que contenía una cepa de *Lactobacillus casei*. Desde entonces se han desarrollado otros muchos productos, cuyo gran reto hoy en día es la constatación científica de sus efectos.

Los nuevos alimentos comenzaron a tener un impacto significativo en los países desarrollados a partir de la segunda mitad de la década de 1990. El mercado internacional de alimentos funcionales, que en 1998 supuso 27.800 millones de dólares, movilizó alrededor de 51.300 millones en 2004. Sólo en Estados Unidos el mercado de alimentos funcionales representó alrededor de 27.000 millones de dólares en 2007 (Granato y col., 2010). En España, los alimentos funcionales constituyeron aproximadamente el 17% del mercado total de alimentos en el año 2006, pudiendo aumentar, según las previsiones, hasta el 40% en 2020 (Mónar, 2007).

El principal factor que ha contribuido al rápido aumento de este mercado es la asociación de la dieta con el desarrollo de distintas enfermedades, por lo que el consumidor percibe que la adquisición de estos productos puede aumentar su esperanza y calidad de vida.

## **I.2.4. La legislación europea sobre los alimentos funcionales**

### ***I.2.4.1. Uso de microorganismos probióticos en alimentos***

Los probióticos para alimentación humana no cuentan con un marco legislativo específico en la Unión Europea. Con la entrada en vigor del Reglamento (CE) 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios (Comisión Europea, 1997), la seguridad de cualquier microorganismo que no hubiera sido utilizado hasta esa fecha debería estar regulada por dicha norma. Dado que la mayoría de los microorganismos probióticos utilizados en productos comerciales ya se encontraban en el mercado con anterioridad a 1997, esto originó que quedaran excluidos de la misma.

Teniendo en cuenta el interés global que suscitan los alimentos probióticos, diferentes grupos de trabajo comenzaron hace aproximadamente una década a

establecer las bases para el uso seguro de microorganismos en los alimentos. Así, los informes de dos grupos de trabajo FAO/OMS reunidos en 2001 y 2002 para evaluar el uso de probióticos dieron lugar a un documento que se publicó en el año 2006 (FAO/OMS, 2006), en el que ya se incluía una guía con las directrices para su evaluación sistemática. En dicha guía se consideran aspectos fundamentales la identificación del género, especie y cepa, la realización de pruebas *in vitro* para su selección, estudios sobre su seguridad y la validación mediante ensayos *in vivo*.

Paralelamente, en la Unión Europea se desarrollaron reuniones de expertos que en último término dieron lugar a la propuesta de la calificación QPS (Presunción Cualificada de Seguridad, por sus siglas en inglés) como herramienta para establecer prioridades en la evaluación de riesgos de la utilización de microorganismos y otros agentes biológicos en la producción de alimentos antes de autorizar su comercialización (EFSA, 2007). Esta calificación sería equiparable al GRAS (*Generally Recognised As Safe*) de la FDA en los Estados Unidos. El esquema para la obtención de la calificación QPS se recoge en la Figura 1.

En esencia, la evaluación de la seguridad un determinado grupo taxonómico (por ej. un género o un grupo de especies relacionadas) se haría sobre la base de cuatro pilares: su caracterización, la información existente al respecto, su posible patogenicidad y su uso final. Si el grupo taxonómico no presenta dudas sobre su seguridad (por ejemplo los lactobacilos, de gran tradición en la producción de alimentos) o, en el caso de existir éstas, se pueden concretar y excluir, dicho grupo pasa a obtener el estatus QPS. A partir de aquí, cualquier cepa de un microorganismo cuya identidad se pueda establecer de forma inequívoca y asignarse a un grupo QPS no necesitaría ser sometida a más estudios de seguridad, salvo el cumplimiento de algún requisito específico. Estos estudios particulares se limitarían únicamente a aquellos aspectos relevantes para el microorganismo en cuestión, por ejemplo determinar si existe resistencia adquirida a antibióticos en una determinada cepa de una bacteria láctica o la presencia de factores de virulencia conocidos en una especie que cuenta con cepas patógenas (EFSA, 2004). Los microorganismos que no obtengan el estatus QPS deberán someter a una evaluación completa de seguridad.

Inicialmente la EFSA estimó en aproximadamente un centenar el número de especies de microorganismos que podrían ser objeto de evaluación. Así se estableció la primera lista de microorganismos con el estatus QPS. Esta lista está sujeta a una revisión al menos anual, aunque en caso necesario se pueden realizar revisiones más frecuentes si existe un requerimiento formal. La última lista se publicó en diciembre de 2012 (EFSA, 2012).

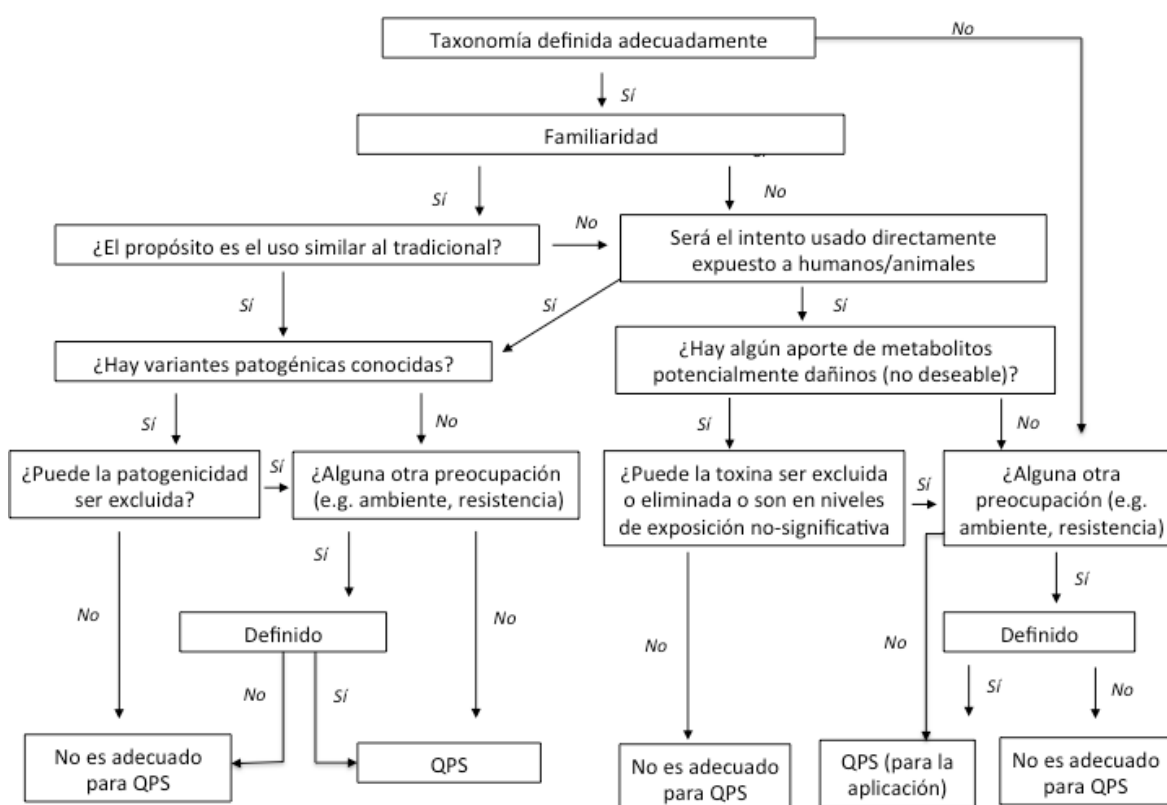


Figura 1. Esquema general para la calificación QPS de un microorganismo.

Fuente: EFSA (2004)

#### 1.2.4.2. Declaraciones de salud

Sin duda, el aspecto que hasta la fecha ha suscitado mayor controversia en relación con los alimentos funcionales ha sido el uso de declaraciones de salud en el etiquetado y publicidad de los mismos.

En la Unión Europea el primer paso para regular las declaraciones de salud fue la creación de la Acción Concertada FUFOSE (*Functional Food Science in Europe*) (ECCR, 2000) cuyo objetivo fundamental fue establecer un enfoque

científico sobre las pruebas que se necesitan para respaldar el desarrollo de productos funcionales. Entre los resultados de esta acción, se describieron por primera vez en Europa una serie de categorías de declaraciones de salud. Posteriormente, la Acción PASCLAIM (*Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods*) estableció criterios comunes para evaluar la confirmación científica de las declaraciones de salud y las bases para la preparación de los informes científicos requeridos para su repaldo. Sin embargo, los resultados de esta última acción no llegaron a implementarse de forma consistente y, así, en el año 2003 se publicó la Propuesta COM/2003/0424 de Reglamento sobre alegaciones nutricionales y propiedades saludables en los alimentos. El resultado de la misma fue la aprobación en el año 2006 del Reglamento (CE) 1924/2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos (Comisión Europea, 1996). En él se armonizan *las disposiciones legales reglamentarias o administrativas de los Estados miembros con el fin de garantizar un funcionamiento eficaz del mercado interior a la vez que se proporciona un elevado nivel de protección de los consumidores*. Esta norma afecta tanto a etiquetado como presentación y publicidad de los alimentos.

El Reglamento CE 1924/2006 distingue tres tipos de declaraciones:

Declaración nutricional: *cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee propiedades nutricionales benéficas específicas*. Por ejemplo, “que contiene”, “que no contiene” o “que contiene proporciones reducidas” de un determinado nutriente.

Declaración de propiedades saludables: *cualquier declaración que afirme, sugiera o dé a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes, y la salud*. Por ejemplo, que un alimento ayuda a mantener un tránsito intestinal adecuado o a mantener los niveles de colesterol.

Declaración de reducción del riesgo de enfermedad: *cualquier declaración de propiedades saludables que afirme, sugiera o dé a entender que el consumo de una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes reduce significativamente un factor de riesgo de aparición de una enfermedad humana*.



Las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables no deberán ser falsas, ambiguas o engañosas, ni dar lugar a dudas sobre la seguridad y/o adecuación nutricional de otros alimentos; tampoco deberán fomentar el consumo excesivo de un alimento.

Para aprobar una declaración de salud será necesario demostrar con fundamento científico en qué medida el efecto declarado es beneficioso y si existe una relación causa-efecto entre el consumo del alimento y el efecto. También será necesario indicar qué cantidad de alimento y cuál es el patrón de consumo requerido para alcanzar el efecto saludable y siempre se acompañará de una declaración en la que se indique la importancia de una dieta variada y equilibrada y un estilo de vida saludable.

### **I.3. COMPUESTOS FUNCIONALES**

A continuación se revisan diferentes aspectos relativos a los efectos, producción y requerimientos nutricionales de algunos de los principales compuestos funcionales que pueden ser sintetizados por microorganismos y que constituyen el objeto de estudio de esta tesis.

#### **I.3.1. Poliaminas**

Las poliaminas son aminas alifáticas de cadena corta. Se consideran constituyentes esenciales de las células de los mamíferos. Poliaminas como la putrescina, la espermidina y la espermina están implicadas en diversos procesos que ocurren en el intestino, como el crecimiento y la diferenciación celular (Bardócz y col., 1995; Löser y col., 1999), el transporte de glucosa (Johnson y col., 1995), la motilidad intestinal (Fioramonti y col., 1994) y la regulación de la actividad disacaridasa (Deloyer y col., 1996). También se asocian con la maduración del sistema inmunitario del epitelio intestinal (ter Steege y col., 1997) y con la prevención de alergias alimentarias (Dandriofosse y col., 2000).

Todas las células eucariotas tienen la capacidad para sintetizar poliaminas. No obstante, aunque en un principio se creía que esta síntesis *in situ* tenía lugar en función de las necesidades del organismo, hoy en día se da cada vez más importancia a las fuentes exógenas, es decir, a las poliaminas aportadas por la dieta o a las que son sintetizadas por la microbiota intestinal (Bardócz y col.,

1995; Capano y col., 1998; Moinard y col., 2005). Las células de los mamíferos son capaces de captar las poliaminas del espacio extracelular mediante un proceso regulado por la concentración intracelular, de modo que se puede suplir la deficiencia en la síntesis endógena (Teixeira de Almeida y col., 2003).

#### ***1.3.1.1. Metabolismo de las poliaminas***

La biosíntesis de poliaminas es un proceso complejo en el que están implicados distintos sistemas enzimáticos. Una posible ruta es la síntesis directa de putrescina, una amina saturada de 4 átomos de carbono, a partir de ornitina, reacción catalizada por la ornitina descarboxilasa (ODC). La putrescina también se puede sintetizar a partir de la arginina mediante la intervención de dos enzimas, la arginina descarboxilasa (ADC) que rinde agmatina, y la agmatina ureohidrolasa (AgUH) que la convierte en putrescina (Figura 2).

Mediante la conjugación de uno o dos grupos aminopropilo, la putrescina da lugar a la formación de espermidina o espermina, respectivamente, por acción de la espermidina sintasa y la espermina sintasa. Para ello actúa como donante de grupos aminopropilo la S-adenosil metionina (SAM), producto de la actividad de la S-adenosil metionina descarboxilasa (SAMDC). Existen también rutas de interconversión de espermina en espermidina y de ésta en putrescina, catalizadas por distintas enzimas y con la intervención de acetilCoA. Así pues, el metabolismo de las poliaminas es un proceso cíclico que permite la transformación de putrescina en espermidina y espermina y viceversa, en función de los requerimientos fisiológicos (Seiler, 1990).

Las poliaminas están presentes tanto en las células eucariotas como en los organismos procariotas, si bien las rutas de síntesis y los mecanismos de regulación difieren dependiendo de su dotación enzimática y de la composición del medio. En general, en los eucariotas se hallan bajas concentraciones de putrescina y mayores niveles de espermidina y espermina. Por el contrario, los procariotas contienen concentraciones más altas de putrescina que de espermidina y normalmente no contienen espermina (Tabor y Tabor, 1985). En las células eucariotas la vía principal de síntesis de poliaminas es la conversión de arginina en ornitina por acción de la arginasa, como parte del ciclo de la urea.

En una segunda etapa la ornitina es descarboxilada a putrescina por la ODC, siendo éste el paso clave para la regulación de la biosíntesis. Cuando la disponibilidad de arginina es baja, otra fuente importante de ornitina es el ácido glutámico (Löser, 2000).

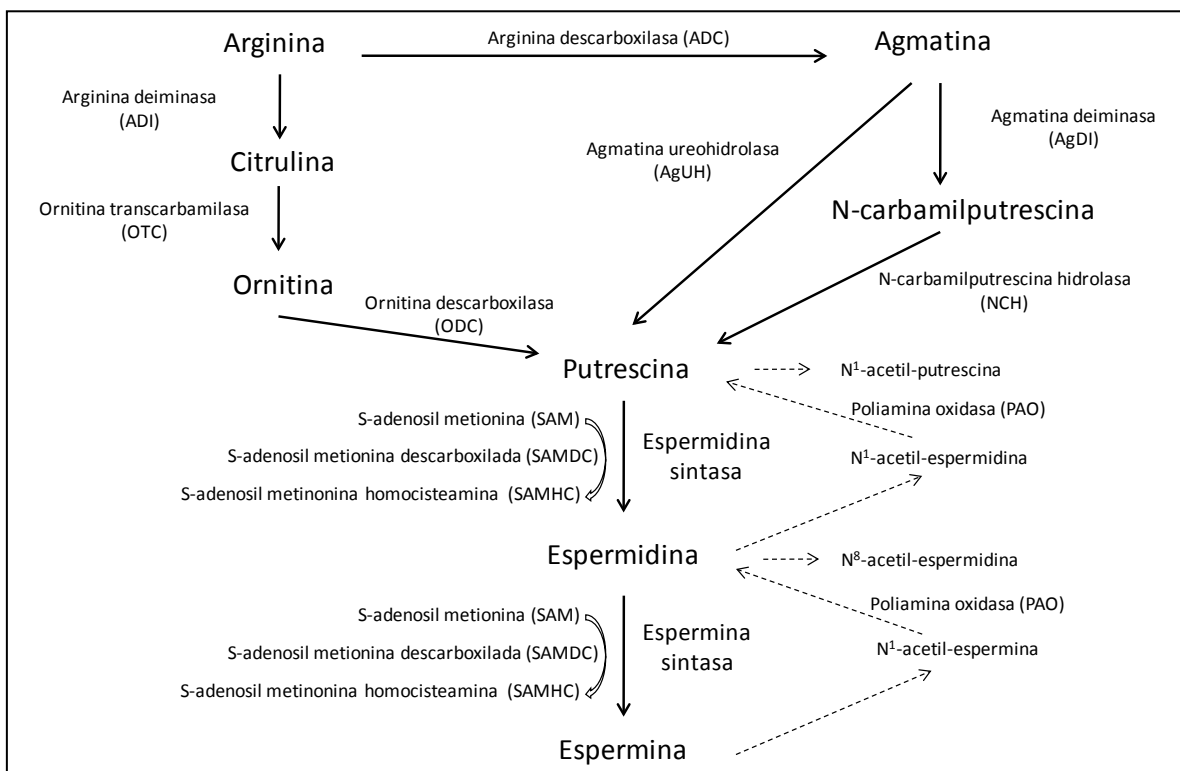


Figura 2. Rutas de síntesis e interconversión de poliaminas.

Fuente: adaptado de Ferrer y col. (2007) y Larqué y col. (2007)

En las células eucariotas la vía principal de síntesis de poliaminas es la conversión de arginina en ornitina por acción de la arginasa, como parte del ciclo de la urea. En una segunda etapa la ornitina es descarboxilada a putrescina por la ODC, siendo éste el paso clave para la regulación de la biosíntesis. Cuando la disponibilidad de arginina es baja, otra fuente importante de ornitina es el ácido glutámico (Löser, 2000).

Además de la síntesis endógena, otra posible fuente de poliaminas para el organismo es su producción por bacterias presentes en el intestino. La síntesis de poliaminas por bacterias es más compleja que en las células eucariotas ya que existen rutas alternativas a la producción directa a partir de ornitina por la ODC.

Así, las bacterias pueden sintetizar poliaminas indirectamente a partir de intermediarios procedentes de la descarboxilación de aminoácidos como la arginina y la lisina. Se han caracterizado descarboxilasas, como la ADC, en numerosos géneros bacterianos, entre ellos *Enterococcus* (Leuschner y col., 1999) y *Lactobacillus* (Vassu y col., 2001). Además, algunas bacterias lácticas poseen enzimas que transforman la arginina en citrulina y ornitina, sucesivamente, como la arginina deiminasa (ADI) y la ornitina transcarbamilasa (OTC) (Ferrer y col., 2007). Por ejemplo, la ruta de la ADI se ha descrito en *Lactobacillus plantarum* N4 y N8 y *Lactobacillus hilgardii* X<sub>1</sub>B (Arena y col., 1999a,b), así como en *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 (Christiansen y col., 2008).

Según sugieren algunos estudios, además de la síntesis a partir de aminoácidos, las poliaminas también pueden ser sintetizadas por bacterias en el intestino grueso a partir de sustratos fermentables de la dieta, como pectinas o goma guar (Santik y col., 1989; Noack y col., 1998).

Por lo que se refiere a los mecanismos de regulación, la biosíntesis de poliaminas en los microorganismos depende de diversos factores como la fase de crecimiento, la temperatura, el pH y la tensión de oxígeno del medio y la presencia de cofactores como el guanósín trifosfato (GTP) o el fosfato de piridoxal. La adición de este compuesto al medio de cultivo estimula la síntesis de aminas (Bover-Cid y Holzapfel, 1999) y puede incrementar hasta 10 veces su producción (Arena y Manca de Nadra, 2001). Por otra parte, la propia concentración de poliaminas ejerce un retrocontrol negativo sobre la síntesis, existiendo también proteínas inhibidoras y activadoras de las enzimas, llamadas antienzimas y anti-antienzimas, respectivamente (Tabor y Tabor, 1985).

### ***1.3.1.2. Efectos biológicos de las poliaminas***

#### ***1.3.1.2.1. Efectos en la proliferación celular y la apoptosis***

La importancia de las poliaminas en el crecimiento y la proliferación celular está bien descrita en el organismo humano. El alto índice de síntesis de poliaminas en el feto y las considerables y significativas variaciones en su contenido durante los primeros días de vida en bebés pre-término y a término, hacen que estos compuestos se hayan asociado con el crecimiento y desarrollo

celular (Casti y col., 1982; 1985). Asimismo, la síntesis de poliaminas, especialmente espermidina, aumenta gradualmente en la glándula mamaria durante el embarazo y la lactancia (Russell y McVicker, 1972). También se han observado elevadas concentraciones de poliaminas durante las etapas de máximo desarrollo, mientras que los niveles disminuyen en la edad adulta (Scalabrino y Ferioli, 1984). Por otra parte, en las enfermedades hiperplásicas, la actividad ODC y los niveles de poliaminas son muy elevados, por lo que se pueden utilizar como biomarcadores (Bachrach, 2004).

Los efectos de las poliaminas en la proliferación celular se relacionan con la estabilización de las cargas negativas del ADN y de la estructura de la cromatina, la regulación de varios factores transcripcionales y la síntesis de proteínas (Hsieh y col., 1994; Franceschin y col., 2008). Sin embargo, una excesiva acumulación de poliaminas induce a la apoptosis, quizás debido al aumento del estrés oxidativo por acumulación de peróxido de hidrógeno en los procesos catabólicos en los que participa la poliamina oxidasa (PAO) (Hoet y Nemery, 2000; Moinard y col., 2005). Así, se ha observado en líneas celulares de epitelio intestinal que un aporte exógeno de putrescina o la inducción de su acumulación intracelular estimulan la apoptosis, mientras que la depleción del contenido de poliaminas por la inhibición de la ODC la reducen (Moinard y col., 2005).

#### **I.3.1.2.2. Efectos en la maduración intestinal**

Durante los primeros meses de vida, el sistema gastrointestinal de los mamíferos debe madurar rápidamente y, en el momento del destete, adaptarse al cambio drástico de la leche al alimento sólido. Para ello, las actividades enzimáticas de los enterocitos cambian, disminuyendo por ejemplo la actividad de la lactasa y aumentando la de la maltasa y la sacarasa (Henning, 1981). Por otra parte, también tiene lugar una adaptación inmunológica del intestino al nuevo contenido antigénico microbiano y alimenticio.

En experimentos con ratas lactantes se ha observado que la administración oral de poliaminas, como espermina o espermidina, induce cambios en distintas actividades enzimáticas relacionadas con la maduración del intestino, tales como la fosfatasa alcalina y las actividades disacaridasa (Dandridge y col., 2000; Peulen y col., 2004a,b). Las poliaminas también tienen otros efectos en la

membrana de los enterocitos, como el aumento del transporte de glucosa (Uda y col., 2002). Por último, también se ha observado que la administración oral de poliaminas tiene efectos tróficos sobre la mucosa intestinal de ratas adultas (Dufour y col., 1988).

#### I.3.1.2.3. Efectos en el sistema inmunitario

Las poliaminas participan en la diferenciación y maduración de las células inmunitarias del intestino (ter Steege y col., 1997), por lo que se relacionan con la regulación de la respuesta inflamatoria y el desarrollo de alergias alimentarias en la infancia. La espermina inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Zhang y col., 1997). Por lo que se refiere a la alergia alimentaria, además de la predisposición genética, uno de los principales factores que favorecen su aparición es la permeabilidad intestinal a las macromoléculas, que se relaciona con la falta de madurez del sistema inmunitario de la submucosa intestinal (lynkaran y Yadav, 1987). Uno de los mecanismos por el que las poliaminas ejercerían estos efectos en el sistema inmunitario parece ser una acción hormonal indirecta sobre el eje pituitario-adrenal (ter Steege y col., 1997).

#### ***I.3.1.3. Las poliaminas en la dieta***

Las poliaminas se encuentran tanto en alimentos de origen vegetal como animal, en niveles que varían desde unos pocos nanomoles hasta algunos micromoles por gramo. De un modo general, las carnes son ricas en espermina, mientras que los vegetales contienen sobre todo putrescina y espermidina (Okamoto y col., 1997). El contenido de poliaminas de la leche es bajo, pero en derivados como el queso y otros productos obtenidos por fermentación, el contenido es superior (Moinard y col., 2005).

Se estima que la dieta normal de un adulto proporciona un aporte diario de poliaminas en torno a 350-500 micromoles al día (Bardócz y col., 1995). Las poliaminas de la dieta son parcialmente metabolizadas durante la absorción intestinal. Más del 80% de la putrescina se transforma en espermidina y espermina o se cataboliza dando lugar a distintos aminoácidos por la vía del succinato. La degradación de la putrescina se debe a la acción de la diamino oxidasa (DAO), una de las enzimas más abundantes en el intestino. Por su parte,

el 70-80% de la espermina y espermidina que se ingieren son absorbidas como tales para su posterior utilización en el organismo (Bardócz, 1995).

En los recién nacidos la leche materna es la principal fuente de poliaminas (Moinard y col., 2005). La leche humana contiene cantidades importantes, del orden de 313, 220 y 24 nmoles/dl de espermina, espermidina y putrescina, respectivamente (Buts y col., 1995). En cambio, el contenido de estos compuestos en las fórmulas infantiles se estima alrededor de 10 veces menor (Buts y col., 1995). De acuerdo con Capano y col. (1998) sólo la leche humana, y no la de vaca ni las fórmulas infantiles, contiene suficientes poliaminas para permitir un desarrollo adecuado del intestino del recién nacido. Se ha estimado que la probabilidad de desarrollar alergia puede alcanzar el 80% durante la lactancia cuando la concentración media de espermina en la leche es inferior a 2 nmol/ml, pero esta probabilidad casi se elimina cuando las concentraciones en la leche son superiores a 13 nmol/ml (Dandrifosse y col., 2000).

La actividad ODC disminuye con la edad (Das y Kanungo, 1982), por lo que es muy importante mantener una adecuada ingesta de poliaminas en la dieta, sobre todo en individuos de edad avanzada.

Finalmente, es importante señalar que pese al evidente papel fisiológico de las poliaminas, los niveles óptimos de suplementación dietética están aún por establecer (Larqué y col., 2007).

#### ***1.3.1.4. Aspectos toxicológicos de las aminos presentes en los alimentos***

Puesto que las distintas aminos poseen actividades biológicas muy diversas, no hay que olvidar que algunas de ellas pueden tener efectos adversos, sobre todo si se ingieren en dosis elevadas.

Como se ha mencionado en apartados anteriores, aminos como la putrescina, la espermina y la espermidina tienen importantes funciones fisiológicas, pero otras, como la tiramina, la histamina, la feniletilamina y la triptamina pueden ser responsables de reacciones adversas en el organismo por sus efectos vasoactivos y psicoactivos, causando, entre otros síntomas, náuseas, dolor de cabeza, sudoración, palpitaciones y problemas respiratorios (Landete y col., 2007).

Las aminas están presentes normalmente en los alimentos, como resultado del metabolismo celular, pero también pueden tener un origen bacteriano (Halász y col., 1994; Silla Santos, 1998). Aunque no existe una cifra generalmente aceptada para describir la toxicidad de las aminas presentes en los alimentos, se pueden tomar como referencia los niveles establecidos por la FDA (1996), según la cual se consideran tóxicas concentraciones en el alimento de 10-100 mg/100 g y 100-800 mg/100 g para histamina y tiramina, respectivamente. Esta gran variabilidad se explica por la diferente sensibilidad de los individuos y por la presencia de potenciadores de la toxicidad en los alimentos implicados. En este sentido, cabe señalar que la putrescina y la cadaverina no son consideradas tóxicas para los individuos sanos, aunque pueden potenciar el efecto tóxico de la tiramina y de la histamina (Bardócz, 1995; Farriol y col., 1999).

En estudios en ratas también se ha observado que las poliaminas pueden presentar efectos tóxicos, aunque a dosis muy elevadas (Til y col., 1997). Los niveles sin efecto adverso observado (NOAEL) se establecieron en 2.000 ppm (equivalentes a 180 mg/kg de peso corporal por día) para la putrescina, 1.000 ppm (83 mg/kg de peso corporal por día) para la espermidina y 200 ppm (19 mg/kg de peso corporal por día) para la espermina, lo que, en caso de que estos datos se pudieran extrapolar al organismo humano, excedería en mucho el contenido que puede aportar una dieta normal.

### **I.3.2. Prebióticos**

Para ser considerado prebiótico, un compuesto debe alcanzar prácticamente intacto el colon y ser fermentado en el mismo por un determinado grupo de bacterias, lo que estimula su crecimiento y favorece los efectos beneficiosos que éstas pudieran desarrollar (Gibson y Roberfroid, 1995). La mayoría de los compuestos prebióticos son carbohidratos no digeribles, que incluyen desde disacáridos, como la lactulosa y el lactitol, hasta polímeros más complejos como la inulina (Fontecha, 2003). No obstante, son los oligosacáridos los que en los últimos años han despertado mayor interés, cuando se observó que podrían ser promotores de la microbiota intestinal deseable, específicamente bifidobacterias y lactobacilos, lo que se conoce como efecto “bifidogénico” (Gibson y Roberfroid, 1995; Fontecha, 2003). En este grupo destacan los



fructooligosacáridos, además de galactooligosacáridos, glucooligosacáridos, isomaltooligosacáridos y xilooligosacáridos (Hugenholtz y Smid, 2002). Los oligosacáridos pueden formarse por hidrólisis ácida o enzimática de polisacáridos, por síntesis enzimática a través de reacciones de transglicosilación u obtenerse por extracción a partir de vegetales (Cheeson, 1993).

Los fructooligosacáridos (FOS) con función prebiótica, como la 1-kestosa o la nistosa (Figura 3), son polímeros de cadena media o corta formados por moléculas de D-fructosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -2-1 o  $\beta$ -2-6 y con una molécula de D-glucosa en uno de sus extremos. El grado de polimerización puede variar de 2 a 35 unidades (Korakli y col., 2003). Su síntesis se debe a la actividad de las fructosiltransferasas (FTF) y se encuentran de forma natural en frutas y verduras, aunque también pueden ser sintetizados por microorganismos, generalmente por elongación a partir de sacarosa (Heyer y Wendenduerger, 2001). Las bacterias y hongos que poseen capacidad para sintetizar FOS también los pueden hidrolizar rápidamente una vez agotado en el medio de cultivo la fuente de carbono, mediante la actividad de las fructanhidrolasas, seguida de una fermentación (Song y Jacques, 1999). A escala comercial los FOS se extraen de la raíz de la achicoria (Niness, 1999) o se obtienen mediante la conversión de sacarosa con enzimas presentes en hongos de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, entre otros (Sangeetha y col., 2005). Al contrario que en los vegetales, en los que se requiere la actividad de dos fructosiltransferasas para la síntesis de fructanos, en los microorganismos sólo es necesaria una fructosiltransferasa para catalizar tanto el inicio como la elongación de la cadena (Velázquez-Hernández y col., 2009).

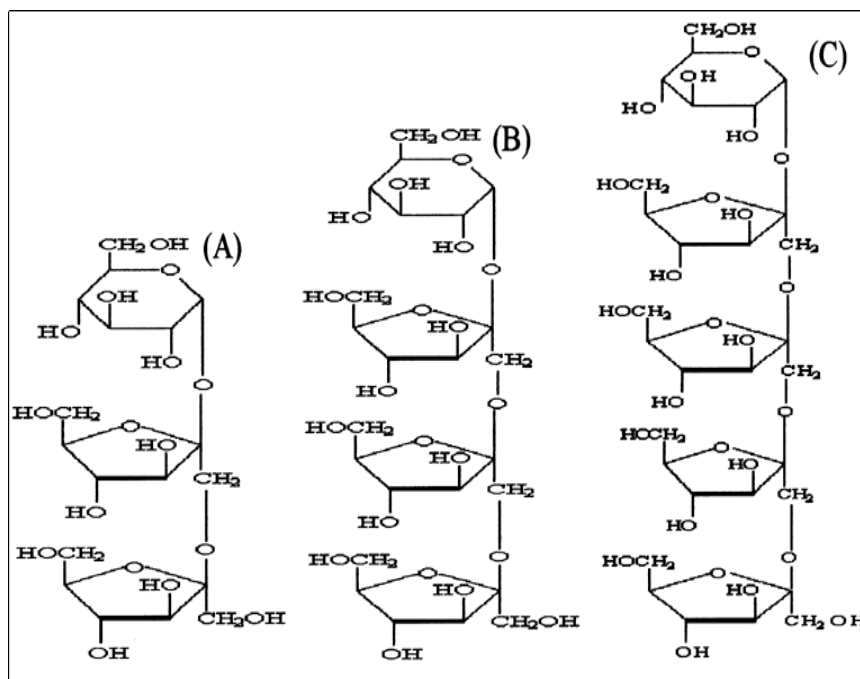


Figura 3. Estructura química de los principales fructooligosacáridos: kestosa (A), nistosa (B) y fructofuranosil-nistosa (C).

Fuente: Passos y Park (2003)

Por su parte, los galactooligosacáridos (GOS) están formados por cadenas de D-galactosa con un residuo de D-glucosa en el extremo reductor de la molécula, respondiendo a la fórmula genérica D-glucosa- $[\beta$ -D-galactosa] $^n$ . Su longitud total es de hasta 10 monómeros. La molécula también puede contener N-acetilglucosamina, ácido siálico y fucosa que, de estar presentes, se disponen en el extremo no reductor (McVeagh y Miller, 1997; Mehra y Kelly, 2006). Los GOS se encuentran de forma natural en la leche, donde se originan a partir de la lactosa mediante la actividad de las galactosiltransferasas (Gal-T), de las que se han caracterizado tres subfamilias,  $\beta$ 1-4-,  $\beta$ 1-3- y  $\alpha$ 1-3- (Amado y col., 1998). Además de las galactosiltransferasas específicas presentes en las células y en los microorganismos, los GOS pueden tener su origen en la actuación de las  $\beta$ -galactosidasas, que aparte de la actividad hidrolítica también pueden presentar actividad de transgalactosilación (Rodrigues y col., 2005). Éste es el caso de muchos microorganismos, tanto bacterias Gram negativas (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*), como Gram positivas (entre ellas bacterias lácticas y bifidobacterias), así como mohos y levaduras (Nakayama y Amachi, 1999; Lamoureux y col., 2002; van Hijum y col., 2002). Por ejemplo, la  $\beta$ -galactosidasa

de *Bifidobacterium adolescentis* presenta ambas actividades (van den Broek y col., 1999). A nivel comercial los GOS se obtienen generalmente mediante  $\beta$ -galactosidasas de origen bacteriano y fúngico. Entre las enzimas más utilizadas se encuentran las de *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* y *Aspergillus oryzae*. Para incrementar su producción se pueden utilizar distintos recursos, como la clonación de enzimas o la mutagénesis química (Ibrahim y O'Sullivan, 2000; Mahoney, 2003).

### **1.3.2.1. Efectos biológicos de los oligosacáridos**

Muchos oligosacáridos, en especial los GOS, presentan configuración  $\beta$  y las enzimas digestivas humanas son principalmente específicas para los enlaces  $\alpha$ , lo que hace que alcancen el intestino prácticamente sin ser digeridos y sirvan de fuente para el crecimiento de las bacterias beneficiosas. Así, el principal efecto de los oligosacáridos deriva de su capacidad para estimular la proliferación de bacterias de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en el colon, al tiempo que inhiben la adhesión y disminuyen la concentración de bacterias patógenas y no deseables como *Clostridium* spp. y *Escherichia coli*, previniendo así el desarrollo de infecciones (Gibson y Roberfroid., 1995; van den Broek y col., 2008).

Los oligosacáridos actúan como análogos de los receptores de las células epiteliales, actuando como ligandos competitivos para microorganismos patógenos y sus toxinas, evitando así su adhesión al epitelio del colon (Newburg, 2000). Esto es de particular interés en los recién nacidos, a los que los oligosacáridos presentes en la leche materna ofrecen una elevada protección frente a las infecciones (Goñi y Gudiel-Urbano, 2001; Boehm y Stahl, 2007). Por otra parte, los microorganismos no deseables producen metabolitos tóxicos como aminas, que pueden reaccionar con nitritos para formar nitrosaminas. Las bifidobacterias, estimuladas por los oligosacáridos en el intestino, degradan las nitrosaminas y además pueden producir compuestos antimicrobianos (Nakaya, 1984; Okamura y col., 1986; Kailasapathy y Chin, 2000).

Gran parte de los efectos biológicos de los oligosacáridos derivan de los ácidos grasos de cadena corta resultantes de su fermentación por las bacterias del colon. Dicha fermentación produce principalmente ácido acético, propiónico y butírico, además de ácido láctico, metano y CO<sub>2</sub>, entre otros productos (Gibson,

1996). La acumulación de ácidos orgánicos origina una disminución del pH intestinal que colabora a la inhibición del desarrollo de bacterias no deseables (van den Broek y col., 2008) y favorece la absorción de minerales (Fontecha, 2003). Por ello, la ingesta de oligosacáridos se asocia con un aumento de la mineralización ósea y la resistencia frente a fracturas (Brouns y Vermeer, 2000). También se ha relacionado a los oligosacáridos, a través del incremento de la producción de ácidos grasos de cadena corta, con la prevención del estreñimiento (Macfarlane y col., 2006), el tratamiento de diarreas de distinta etiología (Chen y Walker, 2005), la reducción de los niveles de colesterol sérico (Beylot, 2005) y con un efecto anticarcinogénico (Macfarlane y col., 2008).

Todas las funciones descritas adquieren un mayor interés en los recién nacidos (Coppa y col., 2004; Kunz y Rudloff, 2008), a lo que habría que añadir que los oligosacáridos de la leche humana podrían desempeñar un importante papel como fuente de ácido siálico, esencial para el desarrollo cerebral del lactante (Baró y col., 2001).

Según distintos estudios, la ingesta de oligosacáridos necesaria para conseguir los efectos deseables en un adulto podría oscilar entre 3 y 15 g/día (Yamashita y col., 1984; Niittynen y col., 2007). Un consumo excesivo puede tener efectos secundarios, como diarrea, distensión abdominal y flatulencia. Por su parte, los recién nacidos alimentados con fórmulas infantiles toleran bien cantidades no superiores a 0,8 g/100 ml (SCF, 2003).

### ***1.3.2.2. Los oligosacáridos en la dieta***

Los prebióticos más caracterizados son la inulina y los FOS. Estos compuestos se encuentran de forma natural en porcentajes variables en más de 30.000 especies vegetales, destacando los cereales, la achicoria, los espárragos, el tomate, la cebolla, el ajo y el plátano. Hace dos décadas el consumo diario medio de prebióticos era de 1-4 g/día en Estados Unidos y de 3-10 g/día en Europa (Van Loo y col., 1995). No obstante, la demanda mundial ha aumentado en la última década y se estima en alrededor de 167.000 Tm y 390 millones de euros (Siró y col., 2008).

La principal fuente vegetal de oligosacáridos es la raíz de la achicoria (*Cichorium intybus*), que puede llegar a contener hasta un 20% de inulina y un

10% de FOS (Niness, 1999). Dado que se trata de un producto que no forma parte habitual de la dieta y que el resto de vegetales contienen cantidades inferiores al 0,7% (Spiegel y col., 1994), en los últimos años ha suscitado particular interés el desarrollo de alimentos funcionales con cantidades significativas de oligosacáridos. Prueba de la evolución de estos productos es el gran número que se comercializa, principalmente en Europa y Japón. En 1996, de los 58 alimentos funcionales aprobados en Japón, 34 incorporaban oligosacáridos (Crittenden y Payne, 1996). En 2003 ya se habían autorizado más de 300 alimentos funcionales, de los que el 30% contenían oligosacáridos en su formulación (Taniguchi, 2004).

Por lo que se refiere a los GOS, su principal fuente es la leche, siendo con diferencia la leche humana la que presenta una mayor concentración, de 5-8 g/l (Kunz y col., 2000). La leche de cabra contiene entre 20 y 30 veces menos, mientras que los niveles en las de vaca y oveja son 200-300 veces inferiores (Martínez, 2004). En la leche humana se ha observado que el calostro presenta una mayor concentración que la leche madura. En conjunto, los oligosacáridos mayoritarios son los fucosilados, aunque una buena parte contiene ácido siálico en su molécula (Goñi y Gudiel-Urbano, 2001).

### **I.3.3. Ácido linoleico conjugado**

Bajo la denominación de ácido linoleico conjugado (CLA) se incluyen diversos isómeros del ácido octadecadienoico (C18:2) con dobles enlaces *cis-trans*, que están presentes en productos lácteos y cárnicos derivados de rumiantes.

La isomería geométrica de los ácidos grasos es importante desde el punto de vista nutricional. La gran mayoría de los ácidos grasos que se encuentran en la Naturaleza poseen isomería *cis* (c). No obstante, la dieta humana también contiene una pequeña proporción (1-7 g/día) de ácidos grasos *trans* (t) (Valenzuela y Mogardo, 1999).

La organización de los dobles enlaces de los ácidos grasos naturales obedece a un patrón muy característico. En un ácido graso diinsaturado, ambos enlaces están separados por un carbono intermedio que no participa en la insaturación. A dicho carbono se le llama carbono metilénico intermedio. Esta

estructura se llama no conjugada y es la que presentan la mayoría de los ácidos grasos en su forma natural. Sin embargo, como consecuencia de la manipulación tecnológica de las grasas y aceites, o en casos particulares por efecto del metabolismo celular de ciertos ácidos grasos, es posible que un doble enlace cambie de posición, desapareciendo el carbono metilénico intermedio. En este caso la estructura pasa a ser conjugada, pudiendo ocasionar además un cambio en la isomería del ácido graso, de modo que uno de los dobles enlaces o ambos pueden adoptar la isomería *trans*.

EL CLA se presenta con diferente isomería: *cis*-7, *trans*-9; *cis*-9, *trans*-11; *cis*-11, *trans*-13; *cis*-12, *trans*-14; *trans*-11, *cis*-13; *trans*-10, *cis*-12; *trans*-7, *cis*-9; *trans*-12, *trans*-14; *trans*-12, *trans*-14; *trans*-11, *trans*-13; *trans*-10, *trans*-12; *trans*-9, *trans*-11; *trans*-8, *trans*-10; *trans*-7, *trans*-9; *trans*-6, *trans*-8 y *cis*-9, *cis*-11. Los principales isómeros con actividad fisiológica son *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12 aunque la forma predominante en los alimentos es el *cis*-9, *trans*-11 (Ogawa y col., 2005; Pestana y col., 2012). Los distintos isómeros de CLA presentan diferentes efectos biológicos relacionados con el metabolismo lipídico y con actividades antioxidante, antiinflamatoria y anticarcinogénica (Parodi, 1999; Pariza y col., 2001; Maggiora y col., 2004). También se están estudiando los posibles efectos del CLA sobre el sistema inmunitario (Sugano y col., 1998).

#### **1.3.3.1. Biosíntesis de CLA**

La síntesis de CLA se produce como parte de los procesos metabólicos de los ácidos grasos insaturados (Figura 4). En los rumiantes, el CLA es sintetizado en el rumen por bacterias del género *Butyrivibrio* (Griinari y Bauman, 1999). El proceso se inicia con la isomerización de ácido linoleico a CLA *cis*-9, *trans*-11, seguida de la hidrogenación del mismo para producir ácido vaccénico (C18:1 *trans*-11), que a su vez se convierte por hidrogenación en ácido esteárico. La velocidad de esta reacción es lenta, por lo que el ácido vaccénico se acumula en el rumen. Por acción de una  $\Delta^9$  desaturasa, el ácido vaccénico se convierte de nuevo en CLA *cis*-9, *trans*-11. Esta reacción tiene lugar principalmente en la glándula mamaria y se considera que esta síntesis endógena es la principal fuente de este isómero en la leche. El ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15) también participa en estas rutas de síntesis (Collomb y col., 2006).

Además de las bacterias del rumen, también se ha observado la producción de CLA a partir de ácido linoleico libre por algunas especies bacterianas que se utilizan en la industria láctea tales como *Propionibacterium freudenreichii*, *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. (Jiang y col., 1998). En este mecanismo participan ácidos grasos hidroxí como intermediarios. Uno de estos ácidos grasos, el ácido ricinoleico (C18:1 *cis*-9, hidroxí-12) puede ser utilizado por numerosas bacterias lácticas para producir importantes cantidades de CLA (Ando y col., 2003).

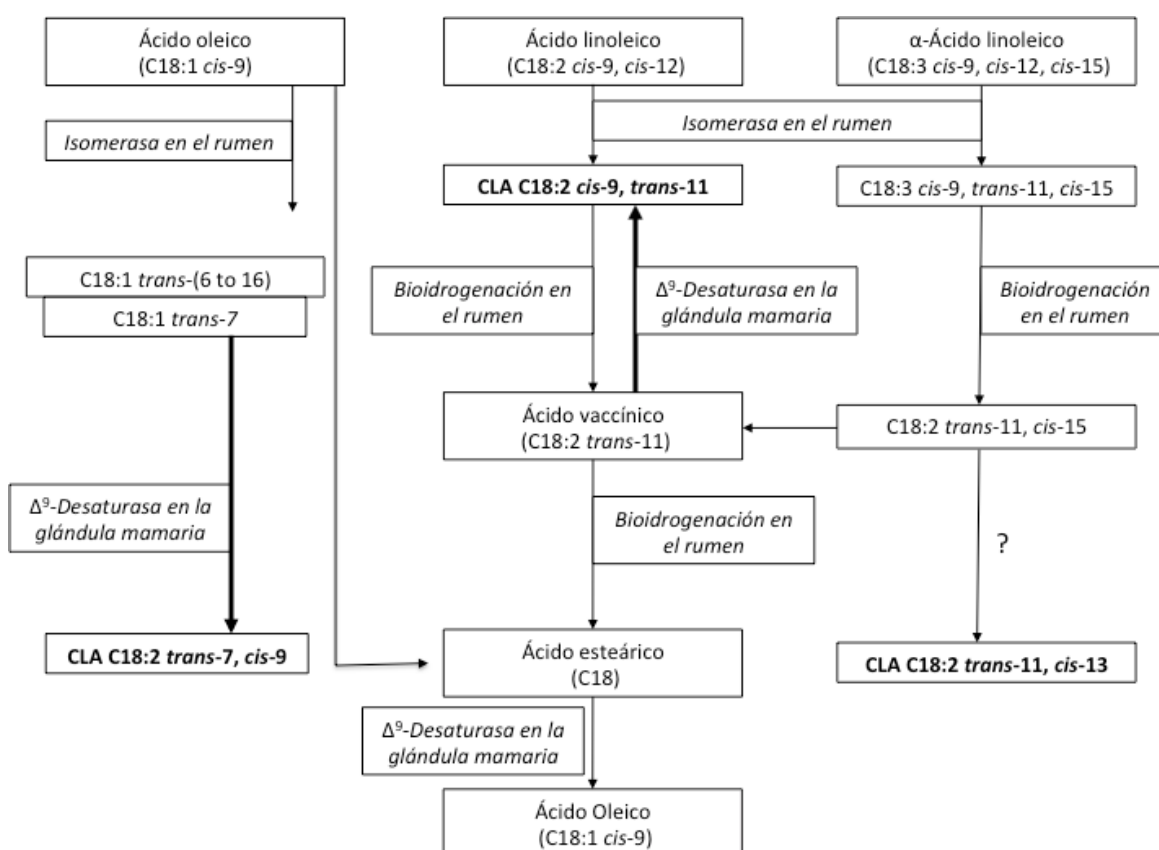


Figura 4. Vía metabólica para la formación de isómeros de CLA.

Fuente: Collomb y col. (2006)

### 1.3.3.2. Efectos biológicos del CLA

#### 1.3.3.2.1. Efecto en la salud cardiovascular

Una gran parte de estudios atribuyen al CLA un efecto antiaterogénico. No obstante también existen trabajos que lo ponen en duda. Se sabe que el CLA

modifica los perfiles lipoproteicos sanguíneos, pero no está muy clara la relación de este fenómeno con la disminución de la deposición de placas de ateroma en las arterias.

La suplementación con CLA reduce los niveles plasmáticos de colesterol de un modo similar a lo que se observa con los ácidos grasos omega-3 (Nicolosi y col., 1997). En estudios con conejos y hamsters se ha observado que la ingesta de CLA reduce las relaciones LDL/HDL y colesterol total/HDL, así como los niveles de triglicéridos (Lee y col., 1994; Nicolosi y col., 1997). Sin embargo, Munday y col. (1999), en trabajos con ratones a los que se suministró una dieta aterogénica (rica en colesterol y grasas saturadas) en combinación con distintos niveles de CLA (0,25 y 0,5% del total de la dieta) observaron un incremento de la aterogénesis en la aorta, pese a que obtuvieron un perfil lipoproteico considerado menos aterogénico.

#### I.3.3.2.2. Efecto anticarcinogénico

Los efectos anticarcinogénicos del CLA son quizás los mejor documentados. Dentro de los diferentes tipos de cáncer, parece que este compuesto tiene un efecto más notorio sobre la prevención del cáncer de mama. En estudios en roedores a los que se indujo el desarrollo de tumores mamarios se ha observado un efecto inhibitorio dosis-dependiente de la administración de CLA (Ip y Scimeca 1997; Visonneau y col., 1997). También se ha demostrado el efecto anticarcinogénico en cultivos de células tumorales humanas, entre ellas células de cáncer mamario MCF/7 (Shultz y col., 1992; Cunningham y col., 1997).

Por otra parte, se han realizado estudios clínicos que señalan una relación inversa entre la ingesta de productos lácteos y la incidencia de cáncer de mama (Knekt y col., 1996; Aro y col., 2000). No obstante, en estos estudios la ingesta de CLA es significativamente inferior al nivel mínimo de 1 g/día que Ip y col. (1994) recomiendan para la prevención del cáncer.

El mecanismo por el que el CLA inhibe la diferenciación celular anormal, que finalmente conduce al desarrollo de un tumor, aún no se conoce completamente. Las investigaciones más recientes apuntan a una acción sobre la expresión de ciertos tipos de ARNm que codifican receptores de membrana involucrados en la transducción de señales (Sébédio y col., 1999). Por otra parte,



los efectos del CLA sobre el sistema inmunitario también parecen guardar una estrecha relación con la prevención de ciertos tipos de cáncer (MacDonald, 2000).

#### I.3.3.2.3. Efecto antioxidante

El posible papel del CLA como antioxidante es un tema controvertido, ya que los resultados obtenidos tanto en estudios llevados a cabo *in vitro* como *in vivo* son contradictorios. Por una parte, existen estudios que demuestran que el CLA disminuye significativamente los niveles de peróxidos y de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (Pariza y col., 2001) y que posee capacidad para secuestrar radicales libres (Banni y col., 1998). Según numerosas revisiones su actividad antioxidante es comparable a la de los antioxidantes sintéticos convencionales (O'Quinn y col., 2000; Kelly, 2001; Devery y col., 2001). Sin embargo, dado que el CLA es más sensible a la oxidación que el ácido linoleico y que los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico (Chen y col., 1997; Zhang y Chen, 1997), también se le podría atribuir un efecto prooxidante. Estos efectos contradictorios del CLA podrían deberse a que la actividad antioxidante o prooxidante de un compuesto depende de la presión parcial de oxígeno del medio (Burton, 1989).

#### I.3.3.2.4. Efecto en la grasa corporal

Este es quizás el efecto del CLA que despierta más curiosidad desde el punto de vista nutricional. En estudios realizados con personas obesas o con sobrepeso se ha observado que la suplementación de la dieta con CLA, con valores en torno a los 6,5 g al día, disminuyen la masa corporal grasa (Blankson y col., 2000) e incrementan la masa corporal magra (Steck y col., 2007). Estos efectos parecen relacionarse con el incremento de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial (Clouet y col., 1998) y con la estimulación de la actividad de la enzima carnitina palmitoiltransferasa (Rahman y col., 2001), además de una reducción de la actividad de la lipasa lipoproteica (Lin y col., 2001).

#### **I.3.3.3. El CLA en la dieta**

Las principales fuentes de CLA en la dieta son la carne y los productos lácteos procedentes de rumiantes. La carne contiene 1,2-8,5 mg de CLA/g de grasa, mientras que en la leche y sus derivados el contenido puede oscilar entre

0,5 y 14,2 mg de CLA/g de grasa (Watkins y Li, 2006). El isómero mayoritario es el *cis*-9, *trans*-11, también llamado ácido ruménico, que en la mayoría de los casos constituye más del 80% del total de CLA. La isoforma *trans*-10, *cis*-12 se encuentra presente por lo general en cantidades inferiores al 5% del total (Chin y col., 1992; Kramer y col., 1997). Otro isómero importante desde el punto de vista cuantitativo es el *trans*-7, *cis*-9, que en los productos derivados de los rumiantes supone un 3-16% (Yurawecz y col., 1998).

El aporte de CLA en la dieta es, lógicamente, muy variable dependiendo de los hábitos alimentarios, pero se estima que una dieta mixta promedio occidental puede proporcionar hasta 1,5 g/día (Parodi, 1994). En los países donde la carne que más se consume es la de cerdo o la de pollo, cabe esperar que el aporte de CLA en la dieta sea considerablemente inferior.

#### **I.3.4. Ácidos grasos de cadena corta**

Gran parte de los carbohidratos de la dieta son fermentados en el colon por la microbiota bacteriana dando lugar a ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acético, propiónico y butírico (Jiang y Savaiano, 1997). El patrón y la cantidad de los diferentes AGCC producidos varían enormemente y depende del carbohidrato utilizado como sustrato (Macfarlane y Macfarlane, 2003). Por ejemplo, la fermentación de la pectina da lugar principalmente a ácido acético, mientras que a partir del arabinogalactano se genera gran cantidad de los ácidos acético y propiónico (Englyst y col., 1987).

Los AGCC proporcionan hasta el 50% de los requerimientos diarios de energía necesaria para el metabolismo del colon. En el intestino intervienen en el transporte de electrolitos y agua, en el crecimiento y diferenciación de la mucosa del colon, en la asimilación de iones como el sodio y en el control de la adhesión de bacterias patógenas (Walker y Dai, 1999; Pelicano y col., 2002; Pérez Chaia y Zárate, 2005). Asimismo, los AGCC participan en la regulación de los lípidos y azúcares en el hígado (Fushimi y Sato, 2005).

#### **1.3.4.1. Efectos biológicos de los AGCC**

Es importante señalar que parte de las funciones biológicas de los AGCC se relacionan con el consumo de carbohidratos no digeribles y no con la ingesta directa de los mismos.

Los AGCC se absorben rápidamente en el colon, contribuyendo a un 5-10% de los requerimientos energéticos de un individuo sano. Una vez absorbidos se metabolizan en los colonocitos y en el hígado, generando acetoacetato e hidroxibutirato, entre otros compuestos, que son esenciales para la proliferación de la mucosa colónica, la formación de mucus, la absorción de iones y la producción de energía (Sakata, 1987; Cummings y MacFarlane, 1997).

Por otra parte, los AGCC son capaces de modificar las respuestas inmunitaria e inflamatoria (Quera y col., 2005; Tedelind y col., 2007), lo que algunos autores relacionan con el alivio de los síntomas de las enfermedades inflamatorias del intestino, como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y la pouchitis (Cummings y col., 1997; Di Sabatino y col., 2005; Wong y col., 2006).

Estudios recientes parecen relacionar a los AGCC con la disminución de la síntesis de colesterol (Demigné y col., 1995) y con una menor absorción de lípidos a nivel intestinal (Roy y col., 2006).

Los ácidos grasos de cadena corta, y en particular el butírico, también participan en la prevención del cáncer de colon. Estudios *in vitro* muestran que este compuesto inhibe la proliferación de células tumorales e induce su diferenciación, promoviendo su retorno a la normalidad; además, el ácido butírico restablece la apoptosis de células cancerosas (Toscani y col., 1988; Hague y col., 1995; Smith y col., 1998). En concreto, actúa como inhibidor de las histona deacetilasas, que intervienen en el crecimiento de tumores (Jaattela, 2004; Broker y col., 2005).

#### **1.3.4.2. Biosíntesis de los AGCC**

Los sustratos más importantes para la síntesis de AGCC son los almidones no digeridos en el intestino delgado y los polisacáridos no digeribles como celulosas, pectinas y xilano (Cummings y Macfarlane, 1991). La microbiota intestinal también puede sintetizar AGCC a partir de proteínas. La biosíntesis de

AGCC requiere en primer lugar la hidrólisis enzimática de estas macromoléculas para que tenga lugar la fermentación de azúcares y aminoácidos (Salyers y Leedle, 1983; Salyers, 1984).

La fermentación de los carbohidratos por las bacterias lácticas puede tener lugar a través de una vía homofermentativa, heterofermentativa o mixta (Stiles y Holzapfel, 1997). Los AGCC se producen en las rutas heterofermentativa y mixta (Yun y col., 2003; Mattila-Sandholm y Saarela, 2003).

Los principales AGCC que se forman en el colon son los ácidos acético, propiónico y butírico, que representan el 85-95% del total (Cummings y Macfarlane, 1991; 1997). En menores cantidades se sintetizan los ácidos valérico, caproico y los de cadena ramificada como el isobutírico (2-metilpropiónico), el 2-metilbutírico y el ácido isovalérico (3-metilbutírico), que se forman en el catabolismo de los aminoácidos valina, isoleucina y leucina, respectivamente (Macfarlane y Macfarlane, 1995). En un individuo sano se estima que la concentración de ácidos orgánicos en el colon es del orden de 10 mM de ácido butírico, 25 mN de ácido propiónico y 60 mN de ácido acético (Scheppach y col., 1995; Macfarlane y Macfarlane, 2003). No obstante, estas concentraciones pueden variar dependiendo de la dieta y, además, son resultado de un equilibrio entre la síntesis microbiana y la absorción en el colon (Macfarlane y Macfarlane, 2003).

En la fermentación también se forman otros productos como ácido láctico, etanol y ácido succínico, que normalmente no se acumulan en el intestino sino que sirven a otras especies de microorganismos para sintetizar AGCC (Bernalier y col., 1999; Bourriaud y col., 2005).

### **1.3.5. Ácido láctico**

El ácido láctico o 2-hidroxipropanoico es el más simple de los ácidos hidroxicarboxílicos. Existen dos estereoisómeros de este compuesto en función de la asimetría del C2, los ácidos L(+)- y D(-)-láctico. Ambas formas se pueden encontrar en la Naturaleza en estado puro o como una mezcla racémica (Gawehn, 1984).

El lactato es un compuesto intermediario del metabolismo de los carbohidratos, que se forma por reducción del ácido pirúvico por las lactato-deshidrogenasas (LDH) dependientes del NAD. Existe una LDH específica para cada isómero (Mack, 2004) y además se han descrito en algunos organismos racemasas que catalizan la conversión entre ambos isómeros (Hove y Mortensen, 1995).

#### ***1.3.5.1. Biosíntesis del ácido láctico***

En el organismo humano, los niveles habituales de ácido láctico en sangre son de 1-2 milimoles/l (Ewaschuk y col., 2005). Principalmente se trata de la forma L(+), dado que los mamíferos únicamente poseen la enzima L(+)-LDH. Esta misma enzima metaboliza rápidamente el L(+)-lactato a ácido pirúvico en el hígado. Por su parte, el ácido D(-)-láctico puede originarse por dos vías: a través del metabolismo del metilglioxal (Thornalley, 1990) o por síntesis bacteriana en el tracto gastrointestinal.

Por lo que a la síntesis bacteriana se refiere, en las bacterias lácticas se conocen tres vías principales de fermentación de las hexosas (Figura 5) (Kandler, 1983). El carácter homofermentativo o heterofermentativo de las bacterias determina que se produzca ácido láctico mayoritariamente o que junto con éste se formen cantidades significativas de ácido acético, acetoína y peróxido de hidrógeno (Porro y col., 1999). Hay bacterias que poseen ambas LDH, mientras que otras sólo poseen la L(+)-LDH o la D(-)-LDH. Así por ejemplo, *Lactobacillus salivarius* produce únicamente el isómero L(+), *Lactobacillus jensenii* sólo sintetiza el isómero D(-) y *Lactobacillus acidophilus* produce siempre la mezcla racémica (Connolly y Lönnerdal, 2004).

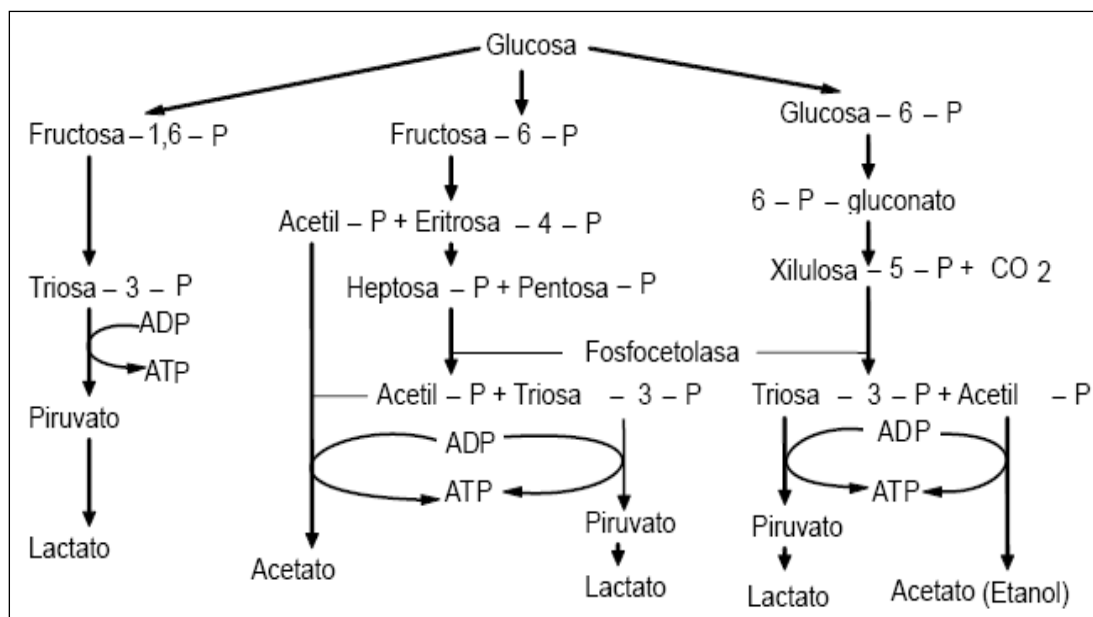


Figura 5. Vías metabólicas en la fermentación de hexosas por bacterias lácticas.

Fuente: Kandler (1983)

### 1.3.5.2. Efectos biológicos del ácido láctico

El ácido láctico, junto con los AGCC, promueve la disminución del pH intestinal, lo que inhibe el crecimiento de bacterias no deseables (Choi y col., 1994). Distintos autores señalan además que el ácido láctico tiene un efecto bactericida por sí mismo (Pelicano y col., 2002; Mack, 2004; De Keersmaecker y col., 2006), que se potencia cuando se encuentra en la forma no dissociada. Por último, otros autores señalan que en el intestino sólo se absorbe una pequeña parte del ácido láctico y que la mayoría es utilizado por otras bacterias presentes en el colon, como las productoras de ácido butírico *Megasphaera elsdenii* y *Mitsuoka multiacid* (Tsukahara y col., 2002).

### 1.3.5.3. Aspectos toxicológicos del ácido láctico

La norma CODEX STAN 72-1981 para las fórmulas infantiles incluía desde su confección una recomendación sobre el empleo de cultivos iniciadores como ingredientes para la producción de alimentos infantiles. En dicha recomendación se establece que sólo se pueden utilizar iniciadores que produzcan ácido L(+)-láctico, sobre la base de que los niños recién nacidos pueden tener dificultades para metabolizar pequeñas cantidades de ácido D(-)-láctico. Esta recomendación se mantiene en la norma revisada del CODEX (CODEX, 2011).

El ácido D(-)-láctico se encuentra normalmente en sangre y orina, aunque en niveles bajos (Ewaschuk y col., 2005). Pese a que los mamíferos no poseen D(-)-LDH, parece que el ácido D(-)-láctico se metaboliza de forma eficiente en adultos sanos mediante la actividad de la enzima D-2-hidroxiácido deshidrogenasa, que se encuentra en una gran variedad de tejidos, entre ellos el hígado. Sin embargo, esta enzima metaboliza el ácido D(-)-láctico a un ritmo del orden de 5 veces inferior al de la L(+)-LDH (Tubbs, 1965; Cammack, 1969).

Según los estudios de Jacobs y Christian (1957) y Droese y Stolley (1962, 1965), los recién nacidos no pueden metabolizar completamente el ácido D(-)-láctico, lo que conduciría a la aparición de acidosis. Por su parte, Mollet (1999) señala que en los recién nacidos la inmadurez del hígado impide una completa metabolización del ácido D(-)-láctico, tanto del ingerido como del producido *in situ*. Según otros autores, tanto en adultos como en recién nacidos, independientemente de qué isómero del ácido láctico esté presente en el intestino, éste constituye un sustrato para las bacterias del tracto gastrointestinal y, por lo tanto, apenas se absorbe (Connolly y Lönnerdal, 2004). Además, muchos de los lactobacilos presentes normalmente en el tracto gastrointestinal, tanto en adultos como en recién nacidos, son productores de ácido D(-) y L (+)-láctico (Reuter, 2001). Por otra parte, los productos fermentados como los encurtidos, embutidos y derivados lácteos fermentados constituyen una importante fuente de ambos isómeros en la dieta y no se han demostrado efectos negativos para la salud en individuos sanos de cualquier edad (Connolly y Lönnerdal, 2004). La acidosis por ácido D(-)-láctico es muy poco frecuente y se asocia a patologías como el síndrome del intestino corto (Hove, 1998; Mack, 2004).

Por lo tanto, según sugieren los últimos estudios, en los niveles séricos de ácido D(-)-láctico influiría más el estado de la función intestinal que la inmadurez del hígado, de cuya menor actividad metabolizadora del ácido láctico en recién nacidos parece que tampoco existen evidencias científicas concluyentes (Connolly y Lönnerdal, 2004).

### **I.3.6. Ácido fólico y otros folatos**

El término folato describe a un grupo de formas químicas que presentan la misma actividad biológica. Las formas naturales (llamadas genéricamente folatos)

son poliglutamatos, mientras que lo que se conoce como ácido fólico es la forma sintética completamente oxidada del ácido pteroilmonoglutámico. Este último es muy estable y de fácil absorción, por lo que se utiliza para la fortificación de los alimentos (Hoffpauer y Bonnette, 1998).

Los folatos actúan como cofactor en el metabolismo de los grupos metilo, siendo esencial para la síntesis de purinas y pirimidinas y, por lo tanto, para la formación de los ácidos nucleicos. En la Figura 6 se muestra un esquema de la participación de los folatos en la síntesis de ADN y en la remetilación de la homocisteína. Como se puede observar, en estas rutas intervienen activamente distintos tetrahidrofolatos. La transformación de homocisteína en metionina promueve la síntesis de S-adenosilmetionina, que es un importante donante de grupos metilo (Finglas y Wright, 2002).

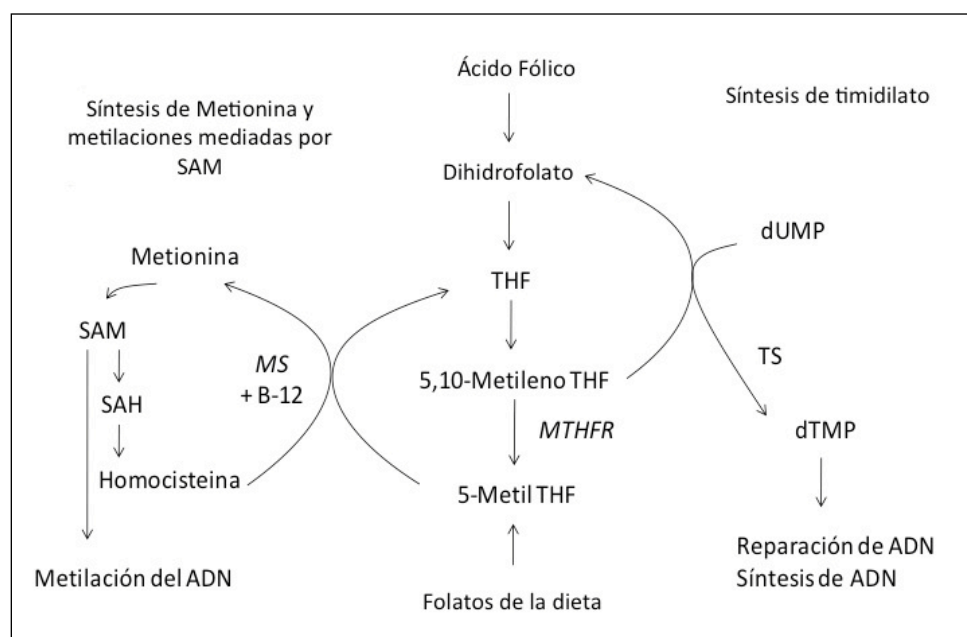


Figura 6. Metabolismo de los folatos.

Fuente: Finglas y Wright (2002)

La deficiencia de folatos origina numerosas enfermedades como anemia, defectos en el tubo neural en el neonato (Lucock, 2000) y enfermedades neurológicas como la depresión o la pérdida de capacidad cognitiva en los ancianos (Calvaresi y Bryan, 2001; Coppen y Bolander-Gouaille, 2005). Además, los folatos se han relacionado con la protección frente a enfermedades



cardiovasculares y diversos tipos de cáncer (Lucock, 2000; Potier de Courcy, 2006).

Los folatos son necesarios para la eritropoyesis, ya que participan en la formación y maduración de los glóbulos rojos en la médula ósea (Koury y Ponka, 2004). Su deficiencia se traduce en la disminución del número de glóbulos rojos que, por otra parte, son anormalmente grandes. Ésta es una de las causas asociadas a la anemia megaloblástica y suele deberse a una ingesta insuficiente de folatos más que a una malabsorción, como sucede con la deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>, otra de las causas de este tipo de anemia (Castle, 1978; Fishman y col., 2000).

Un bajo nivel de folatos en la sangre durante la gestación incrementa el riesgo de malformaciones congénitas en el recién nacido y favorece el desarrollo de enfermedades crónicas durante la vida adulta. Por eso se han establecido recomendaciones para la suplementación de la dieta con ácido fólico, lo que ha conseguido aumentar los niveles sanguíneos y disminuir la incidencia de espina bífida (Molloy, 2002). No obstante, la biodisponibilidad de folatos en la sangre no sólo depende de la ingesta, sino también de factores genéticos. Estudios realizados en diferentes grupos étnicos muestran que la mutación del gen que codifica la síntesis de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), enzima clave en el metabolismo de los folatos, resulta en una reducción de su actividad en un 50%, lo que se traduce en un menor nivel de folatos en sangre (Schneider y col., 1998).

Como se ha mencionado, la homocisteína es un intermediario del metabolismo de los folatos. Los niveles elevados de homocisteína en el plasma son un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular (Molloy y Scott, 2001). Numerosos estudios señalan que el ácido fólico disminuye estos niveles (Brouwer y col., 1999; Christen y col., 2000), por lo que se le atribuye un efecto beneficioso sobre la función endotelial, cuya alteración es una etapa temprana en la aterogénesis. No obstante, además de la regulación de los niveles de homocisteína, parece que existen otros mecanismos por los que el ácido fólico mejoraría la función endotelial. En este sentido, distintos autores señalan que el ácido fólico participa también en la regulación de los niveles de óxido nítrico (NO)

en el endotelio mediante la inhibición del estrés oxidativo y la regulación de la enzima NO sintasa (Verhaar y col., 2002).

Dado el papel de los folatos en los procesos de metilación y síntesis de nucleótidos, hay estudios que relacionan los bajos niveles de éstos en el organismo con alteraciones en la estabilidad del ADN (Peters y col., 2005), lo que se relacionaría con la prevención de ciertos tipos de cáncer, en particular el de colon (Varela Moreiras y col., 2005).

Finalmente, se está investigando la posible relación de algunos desórdenes neurológicos, como la enfermedad de Alzheimer, con bajos niveles de folato o elevadas tasas de homocisteína en el plasma, aunque de momento aún es difícil determinar si se trata de una causa o de un efecto (Molloy y Scott, 2001; Nilforooshan y col., 2011; Coppedè y col., 2012).

#### ***1.3.6.1. Biosíntesis de folatos***

Muchas plantas y microorganismos, entre los que se encuentran las bacterias lácticas (Lin y Young, 2000), poseen la capacidad para sintetizar folatos y servir así de fuente para los vertebrados. La biosíntesis de folatos implica la unión de los tres componentes de la molécula: el anillo de pteridina, el ácido *p*-aminobenzoico (PABA) y el ácido glutámico. La pteridina deriva del GTP procedente de la biosíntesis de las purinas. El PABA se origina a partir del ácido corísmico y puede ser sintetizado por la misma ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos: glicolisis, la ruta de las pentosas-fosfato y la ruta del shikimato. El tercer componente de la molécula es el glutamato, que normalmente se capta del medio. Estos tres componentes se modifican y acoplan para sintetizar folato en una serie de reacciones que requieren la participación de seis enzimas (Figura 7). En la etapa final se forma poliglutamilfolato por incorporación de moléculas de glutamato al residuo glutamil de la estructura básica mediante la intervención de la poliglutamilfolato sintetasa (Sybesma y col., 2003).

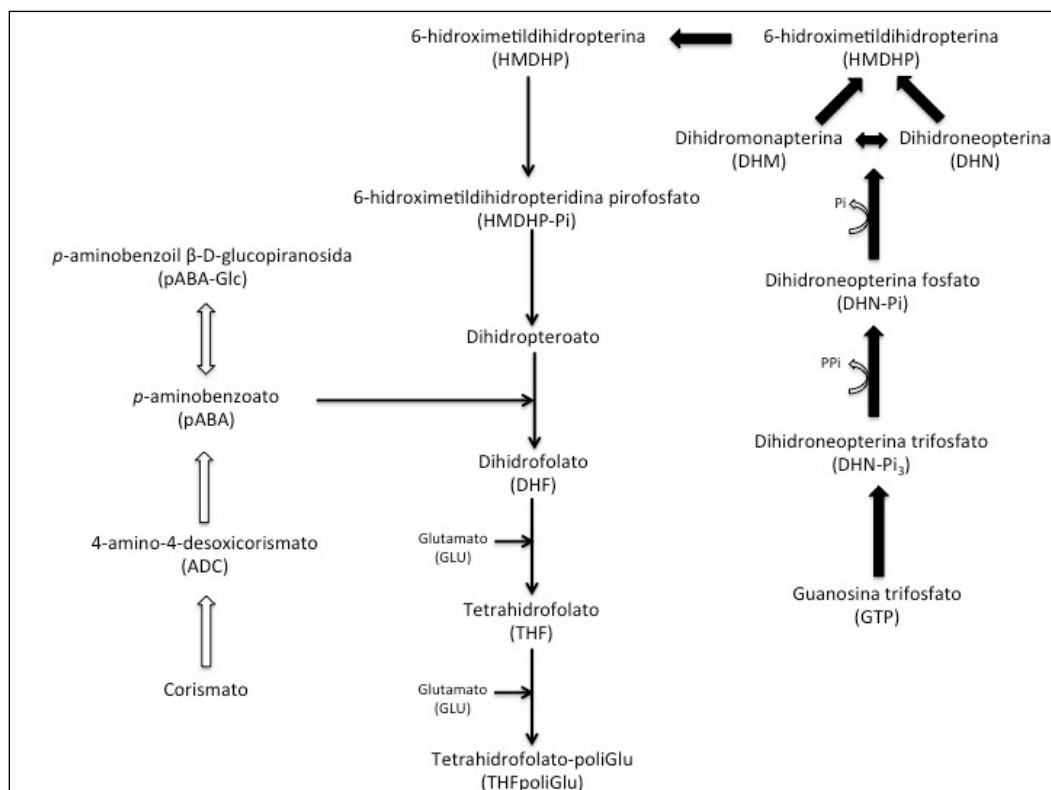


Figura 7. Ruta de síntesis de folatos.

Fuente: adaptado de Green y col. (1996) y Quinlivan y col. (2006)

### ***1.3.6.2. Los folatos en la dieta***

En la dieta, el ácido fólico procede principalmente de los alimentos de origen vegetal. Incluso algunos productos cuyo contenido no es muy elevado pueden contribuir de forma importante a la ingesta cuando se consumen de forma habitual, como por ejemplo los cítricos (Crider y col., 2011). Dada la capacidad de las bacterias lácticas para sintetizar folatos (Lin y Young, 2000), algunos alimentos fermentados como los lácteos también pueden aportar cantidades relevantes de los mismos (Konings y col., 2001; Crittenden y col., 2003). Hoy en día, en algunos países como los EE.UU., otra fuente importante de folatos son los suplementos de ácido fólico sintético, que se puede comercializar como producto nutracéutico o añadir a los alimentos para su fortificación. No obstante, existen datos que indican que un consumo excesivo de alimentos enriquecidos en ácido fólico puede tener efectos negativos como el enmascaramiento de la deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>, que es frecuente en los ancianos. Esta vitamina también participa en los procesos de metilación y su deficiencia produce la anemia perniciosa, que

puede dar lugar a neuropatía y anemia megaloblástica, morfológicamente idéntica a la que parece en la deficiencia de folato. Por ello, algunas autoridades sanitarias fijan la ingesta máxima tolerable de ácido fólico en 1.000 µg/día. Aún así, cuando se suplementa la dieta con ácido fólico se recomienda su administración conjunta con vitamina B<sub>12</sub>.

La ingesta diaria recomendada de folato para un adulto es de 200-400 µg, aunque en el caso de las mujeres embarazadas se recomiendan niveles superiores (400-600 µg) (Sybesma, 2003). Si bien los bajos niveles de folatos en sangre pueden deberse a factores independientes de la dieta (factores genéticos, ciertos estados fisiológicos, etc.), está demostrado que la causa más importante de la deficiencia de folato es un ingesta insuficiente. Se ha comprobado que el contenido total de folato de una dieta media es menor que la ingesta diaria recomendada y se ha visto que una deficiencia de ácido fólico entre baja y moderada es bastante común entre la población de los países industrializados (Brussaard y col., 1997; Konings y col., 2001).

Los folatos que aporta la dieta se encuentran en forma conjugada, conteniendo una cola poliglutamil. La absorción en el intestino sólo se produce en forma monoglutamil y para ello, el intestino humano posee una enzima poliglutamil folato hidrolasa, que elimina la cola glutamil, dejando así el folato disponible para poder pasar al interior de la célula (Brouwer y col., 1999). Distintos estudios señalan que la biodisponibilidad del ácido fólico sintético (monoglutamil folato) es mayor que la de los folatos naturales (Clifford y col., 1991; Melse-Boonstra y col., 2004), ya que la absorción de ácido fólico requiere una menor actividad hidrolasa. Además, se ha visto que la actividad de esta enzima puede disminuir en presencia de ciertos componentes de los alimentos y que en algunos individuos dicha actividad puede estar reducida de forma natural por polimorfismo genético o como consecuencia de ciertos hábitos de consumo que alteran el pH intestinal (Gregory, 2001). Por otra parte, también se ha señalado que el ácido fólico es más estable que la mayoría de los folatos naturales, a excepción del 5-formiltetrahidrofolato (Brouwer y col., 1999).

## I.4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El gran interés que existe hoy en día por la relación entre alimentación y salud hace que la investigación en el campo de los alimentos funcionales se encuentre en constante expansión. En la dieta de los países industrializados se puede observar un notable desequilibrio entre la proporción de los nutrientes que se deberían ingerir en función de las necesidades y lo que realmente se ingiere, lo que puede ser, al menos en parte, causa de las llamadas enfermedades de la civilización (diabetes, trastornos cardiovasculares, obesidad, hipercolesterolemia, hipertensión, estreñimiento). Con la producción de alimentos funcionales se pretende suministrar al consumidor productos que, además de su valor puramente nutricional, permitan modular ciertas funciones en el organismo, contribuyendo a evitar estas y otras patologías. Son muchos los ingredientes funcionales o bioactivos que se incorporan a distintos alimentos como vitaminas, minerales, fibras, ácidos grasos *n*-3, esteroides, isoflavonas, etc. Sin embargo, hay otros compuestos de interés que hasta la fecha cuentan con menos estudios, como las poliaminas, los folatos o los ácidos grasos de cadena corta.

Por otra parte, las posibilidades de elaboración de los alimentos funcionales incluyen no sólo la adición a los mismos de compuestos bioactivos, sino también la incorporación de microorganismos probióticos capaces de sintetizarlos en el alimento o en el propio intestino, estrategia que resultaría de gran interés en los productos fermentados. Para su utilización con este fin resulta imprescindible como paso previo caracterizar la capacidad de síntesis de compuestos funcionales por los posibles microorganismos de interés, estudios que deben complementarse con la determinación de su aptitud tecnológica y, si es necesario, con ensayos sobre su seguridad.

Este trabajo se ha centrado en la caracterización de la producción de poliaminas, ácido linoleico conjugado, ácidos grasos de cadena corta, folatos y oligosacáridos, por parte de bacterias potencialmente probióticas aisladas de distintas fuentes, entre ellas la leche humana.

El **objetivo general** de esta tesis doctoral ha sido estudiar la capacidad de distintas cepas de bacterias para sintetizar compuestos funcionales, con vistas a su posible inclusión en los alimentos o como fuente para la producción industrial

de los mismos.

Para ello se plantearon los siguientes **objetivos parciales**:

- Evaluar en las bacterias seleccionadas las actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de los compuestos de interés.
- Identificar y cuantificar los compuestos bioactivos producidos por las bacterias en distintas condiciones de incubación.
- Establecer qué cepas podrían ser de objeto de estudios complementarios para su futura utilización en la industria alimentaria.



## MATERIAL Y MÉTODOS





## II.1. MATERIAL

### II.1.1. Material biológico

Se estudiaron 17 cepas de bacterias procedentes de distintos orígenes y pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* y *Staphylococcus* (Tabla 2).

Tabla 2. Cepas bacterianas objeto de estudio.

Cepa	Especie	Origen
LC40	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Leche humana
LC9, LM19, LM21, LM22	<i>Lactobacillus gasseri</i>	Leche humana
HLM24	<i>Lactobacillus gasseri</i>	Heces de niño
HN6	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Heces de niño
Q8	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	Queso
NCFB2739	<i>Lactobacillus curvatus</i>	NCFB
LM18, LM24	<i>Enterococcus faecalis</i>	Leche humana
LJx4, LM27	<i>Enterococcus faecium</i>	Leche humana
CECT4839	<i>Bifidobacterium breve</i>	CECT
CECT4552	<i>Bifidobacterium infantis</i>	CECT
CECT5776	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	CECT
LM10	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Leche humana

NCFB: *National Collection of Food Bacteria*; CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

Las cepas aisladas de muestras humanas y alimentos fueron cedidas por el Dr. Juan Miguel Rodríguez Gómez, del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Estas cepas habían sido previamente aisladas e identificadas por el grupo de investigación del Dr. Rodríguez mediante secuenciación 16S rRNA y PCR especie-específica (Martín y col., 2003, 2005b). Las cepas restantes fueron suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y la *National Collection of Food Bacteria* (NCFB, Reino Unido).

### II.1.2. Material general de laboratorio

El agua destilada para la preparación de medios de cultivo y reactivos se obtuvo por ósmosis inversa en un aparato Millipore mod. Elix 3. Las fases móviles para HPLC se prepararon con agua Milli-Q, para cuya obtención se empleó un aparato Milli-Q System de Millipore.

Las pesadas ordinarias se efectuaron en balanzas monoplato Kern mod. 440-33N y AND mod. GF-2000. Las pesadas de precisión se realizaron en una balanza analítica AND mod. HR-120.

Para la congelación de las muestras y sus extractos se utilizaron arcones Liebherr mod. Electronic a -25 °C y Heraeus mod. Hera Freeze a -80 °C. Las muestras y reactivos que precisaban almacenamiento en refrigeración se conservaron en cámaras frigoríficas Liebherr mod. Premium Frost-Free termostatada a  $4\pm 1$  °C.

La determinación del pH se llevó a cabo con pHmetros Crison mod. microPH2001 y Beckman mod. pH/ISE.

La desgasificación de las fases móviles para HPLC se realizó en un aparato de ultrasonidos Selecta mod. 617, acoplando las soluciones a una bomba de vacío Eyela mod. A-3S.

La esterilización de los medios de cultivo se llevó a cabo en autoclaves Selecta mod. Austester- y Austester-G y Raypa mod. AES-75, a 121 °C durante 15 min.

Para mantener la temperatura de los medios de cultivo y en los ensayos enzimáticos se utilizaron baños de agua termostáticos de la marca Bunsen mod. BD y BA-12.

Los recuentos microbiológicos se realizaron en placas de Petri esterilizadas desechables de 90 mm de diámetro de la marca Sterilin.

Se utilizó una estufa Heraeus mod. B-6200 para las incubaciones en aerobiosis y una cámara miniMACS Anaerobic Workstation cuando se requirió anaerobiosis.

Los agitadores magnéticos fueron suministrados por Selecta y Thermolyne, y los de tubo por Heidolph y Velp.

Para la agitación-incubación de las muestras se empleó un agitador orbital IKA mod. KS-125 situado en una estufa Selecta mod. Medilow-M a 37 °C.

Para la centrifugación de las muestras se emplearon centrífugas Sorvall mod. RC-5B y Heraeus mod. Biofuge 400R y mod. PicoBiofuge.

Los extractos intracelulares bacterianos se obtuvieron con un disruptor B. Braun mod. MSK, acoplado a una bombona de CO<sub>2</sub> para evitar el sobrecalentamiento durante el proceso.

La concentración de volúmenes relativamente grandes de disolventes orgánicos se efectuó en un rotavapor Buchi mod. R-200, acoplado a un baño calefactor Buchi mod. B-490 y a una bomba de vacío Eyela mod. A-3S. Los volúmenes pequeños de disolventes orgánicos se evaporaron bajo corriente de nitrógeno industrial.

La deshidratación de las muestras se realizó en liofilizadores Labconco mod. Lyph-Lock 12 y Telstar mod. Lioalfa-10.

Para las determinaciones espectrofotométricas se utilizaron espectrofotómetros UV-VIS Hitachi mod. U-2000 de doble haz y Jenway mod. 6305.

La clarificación de las muestras se efectuó a través filtros Whatman nº 54 y Millipore de 0,20 y 0,45 µm de diámetro de poro.

En los distintos análisis se utilizaron pipetas automáticas Eppendorf mod. 20, 200, 1000 y 5000C, y multicanales Labsystem mod. Finnipipette. También se utilizaron pipeteadores automáticos Falcon mod. Pipet-aid e Integra Biosciences mod. Pipetboy Acu, así como dispensadores Brand mod. Seripettor, de 25 y 50 ml de capacidad.

El material de vidrio fue suministrado por Pyrex y Pobel.

En el desarrollo de estas investigaciones también se han utilizado otros equipos de uso general: homogeneizadores, mecheros Bunsen, desecadores de vidrio, contadores de colonias, máquinas de hielo, etc.

Los reactivos y disolventes utilizados en este trabajo fueron suministrados por Merck, Sigma, Panreac y Fluka.

El test enzimático para el estudio de la producción de ácido láctico fue suministrado por Roche.

### II.1.3. Material específico para cromatografía

Los análisis de poliaminas y aminas biógenas se llevaron a cabo en un equipo HPLC Beckman mod. 166 equipado con un detector UV y una columna C18 ACE 5 V04-532 (25 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula), protegida mediante una precolumna ACE H0005 (1 cm x 4,6 mm). Ambas columnas fueron suministradas por Advanced Chromatography Technologies. Para mantener la temperatura de la columna se utilizó una camisa calefactora Jones Higchrom mod. 7971. El control del equipo, la obtención de cromatogramas y los posteriores análisis se llevaron a cabo mediante el software System Gold Nouveau versión 1.6.

Para el análisis de las isoformas del ácido linoleico conjugado (CLA) se empleó un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer mod. 8420, equipado con un detector de ionización de llama y una columna Carbowax/BTR (30 m x 0,32 mm) suministrada por Quadrex Corporation.

La separación y cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Konik mod. KNK-3000-HRGC equipado con un detector de ionización de llama y una columna FFAP (30 m x 0,53 mm), suministrada por Quadrex Corporation.

Los galactooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS) se analizaron en un cromatógrafo HPLC 2695 Alliance acoplado a un detector de índice de refracción. Para la separación de los GOS se empleó una columna MCI GEL CK08E (300 x 8,0 mm), suministrada por Mitsubishi Chemical. Para el análisis de los FOS se utilizó una columna C18 Luna (NH<sub>2</sub>) Amino (250 x 4,6 mm y 5  $\mu$ m de tamaño de partícula) suministrada por Phenomenex.

Para la separación de los folatos de las muestras se emplearon columnas rellenas con gel de proteína de unión a folato (proteínas de leche bovina) con capacidad de unión de 8 $\mu$ g ácido fólico/mg de proteína (Scripps Laboratories) y cartuchos Oasis de equilibrio hidrofílico-lipofílico (1 ml, 30 mg, 30  $\mu$ m de tamaño de partícula) suministrados por Waters. Los cartuchos eran copolímeros de macroporos constituidos por dos monómeros, el lipofílico de N-divinilbenzeno y el hidrofílico de N-vinilpirrolidona. El componente hidrofílico aumenta la humectabilidad del polímero, mientras que el lipofílico promueve la interacción en

fase reversa necesaria para retención de los analitos. El análisis de los folatos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Se utilizó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo API 3000 (Applied Biosystems) acoplado a una bomba de HPLC y a un inyector automático (Perkin-Elmer Series 200). Para la separación de los folatos se utilizó una columna Zic-Hilic (150 x 4,6 mm) (SeQuant).

Todos los gases empleados para los análisis cromatográficos (nitrógeno, aire, hidrógeno y helio), de alto grado de pureza, fueron suministrados por Carburos Metálicos.

Los patrones utilizados para la identificación de poliaminas y aminas biógenas, así como los empleados en los análisis de CLA y azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa) fueron suministrados por Sigma. Para la identificación de los AGCC se utilizaron patrones de Fluka y para los análisis de ácido fólico y folatos se emplearon patrones suministrados por Eprova. Para la identificación de los FOS (1-kestosa, nistosa, 1f-frutofuranosil nistosa) fueron suministrados por Meiji Seika Kaisha.

#### **II.1.4. Medios de cultivo**

Todas las cepas se propagaron en caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y para su conservación se congelaron a -20 °C con un 10% de glicerol, como agente crioprotector.

Los recuentos de *Enterococcus* spp. se realizaron en agar KAA (sulfato de kanamicina, azida sódica y esculina). Para los recuentos de *Lactobacillus* sp. se utilizó agar MRS. Los recuentos de *Bifidobacterium* sp. y *Staphylococcus* sp. se realizaron en Bifidobacterium Selective Medium (BSM) y agar Baird Parker, respectivamente. Todos los medios de cultivo fueron suministrados por Pronadisa y Oxoid.

Para la determinación de la capacidad fermentativa de los microorganismos se utilizaron galerías de pruebas de fermentación en tiras (API 50 CH, bioMérieux) junto con el medio API 50 CHL.

## II.2. METODOLOGÍA

### II.2.1. Estudio de la producción de poliaminas y aminos biógenas

#### II.2.1.1. Activación y crecimiento de los cultivos bacterianos

Las cepas congeladas se revitalizaron mediante la inoculación de una porción de cultivo congelado en 9 ml de caldo MRS, seguida de incubación a 37 °C durante 24 h. Con la finalidad de inducir en los microorganismos la producción de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), se realizaron cinco pases transfiriendo 100 µl a tubos con 10 ml de caldo MRS al que se añadió un 0,1% de monohidrocloreto de ornitina y un 0,005% de fosfato de piridoxal, que actúa como cofactor de la reacción de descarboxilación (Gale, 1946; Recsei y col., 1985). Los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 h.

A continuación, las cepas se inocularon en matraces que contenían 200 ml de un medio de crecimiento que se preparó según las indicaciones de Bover-Cid y Holzapfel (1999). Este medio, basado en el MRS (De Man y col., 1960) y en el de Joosten y Northold (1989), incluye entre sus componentes, además de monohidrocloreto de ornitina (0,25%) y fosfato de piridoxal (0,005%),  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ , citrato amónico y tiamina (Tabla 3), para potenciar el crecimiento de las bacterias lácticas. El pH del medio se ajustó a 5,3.

Cada cepa se incubó durante 4 días a 37 °C en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, con la excepción de las cepas de *Bifidobacterium* spp., que únicamente se incubaron en condiciones de anaerobiosis. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

#### II.2.1.2. Extracción de las aminos

Tras la incubación de las cepas en el medio de crecimiento se tomaron 10 ml del mismo, a los que se añadió 1,7-heptanodiamina (20 µM) como estándar interno para el análisis cromatográfico. La mezcla se agitó durante 5 min y a continuación se centrifugó a 12.000 g durante 6 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se extrajo con igual volumen de HCl 0,1N, tras lo cual se realizó otra centrifugación a 12.000 g durante 6 min a 4 °C (Bover-Cid y Holzapfel, 1999). Finalmente, al sobrenadante obtenido se le adicionó NaOH 2N hasta conseguir un pH superior a 13.

Tabla 3. Composición (%) del medio propuesto por Bover-Cid y Holzapfel (1999) para inducir la producción de ornitina descarboxilasa.

Componente	%
Tryptona	0,5
Extracto de levadura	0,5
Extracto de carne	0,5
Clorato de sodio	0,25
Glucosa	0,05
Tween 80	0,1
MgSO <sub>4</sub>	0,02
MnSO <sub>4</sub>	0,005
FeSO <sub>4</sub>	0,004
Citrato de amonio	0,2
Tiamina	0,001
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2
CaCO <sub>3</sub>	0,01
Fosfato de piridoxal	0,005
Aminoácido	1,0
Bromocresol	0,006
Agar	2

### II.2.1.3. Análisis cromatográfico de las aminas

Para derivatizar las aminas se añadieron a las muestras 10 µl de cloruro de benzoílo al 99% (Mei, 1994). La mezcla se agitó durante 15 s y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 20 min con agitación periódica. A continuación, la muestra se extrajo dos veces consecutivas con 10 ml de éter dietílico. La fracción etérea se evaporó en un rotavapor y el extracto obtenido se disolvió en 1 ml de fase móvil (acetonitrilo/agua, 42/58, v/v). Antes de su inyección en el cromatógrafo, la muestra se clarificó a través de filtros de 0,22 µm.

Las poliaminas y aminas biógenas se analizaron por HPLC. Para ello se inyectaron 20 µl en una columna C18 con un tamaño de partícula 5 µm y unas dimensiones de 4,6 x 250 mm, conectada a una precolumna de 1 cm x 4,6 mm. La columna se mantuvo a 30 °C.



Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetonitrilo/agua (42/58, v/v) que se desgasificó antes de su utilización por ultrasonicación a vacío. Se empleó un flujo de 1 ml/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 198 nm.

La identificación de las aminas se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención de los picos cromatográficos obtenidos con los de una solución patrón. Ésta se preparó a partir de una solución acuosa de HCl 0,1N a la que se añadieron putrescina, espermidina, espermina, triptamina, cadaverina, tiramina, feniletilamina, histamina y 1,7-heptanodiamina, todas ellas en una concentración 2  $\mu$ M. Tras ello se procedió a su derivatización con NaOH 2N y cloruro de benzoílo, siguiendo la misma pauta que con las muestras.

La cuantificación de las aminas se llevó a cabo mediante el método del estándar interno.

## **II.2.2. Determinación de la producción de CLA**

### **II.2.2.1. Preparación de las muestras**

En primer lugar se procedió a revitalizar las cepas mediante tres pases en caldo MRS a 37 °C durante 24 h, tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis. A continuación se sembraron 2 ml del inóculo obtenido en el último pase en 200 ml de caldo MRS adicionado de un 0,02% de ácido linoleico como precursor del CLA. Para facilitar la dispersión del ácido linoleico en el medio se añadió un 1% de Tween 80. Las cepas se incubaron a 37 °C durante 24 y 48 h en aerobiosis y anaerobiosis.

### **II.2.2.2. Extracción de la fracción lipídica**

Finalizada la incubación, los cultivos se centrifugaron a 8.000 g durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes se utilizaron para estudiar la producción extracelular y los sedimentos para determinar la producción intracelular de CLA.

A los sobrenadantes se les añadieron 14  $\mu$ l/ml de una solución en hexano de ácido heptadecanoico (6,44 mg/ml) como estándar interno (Alonso y col., 2003). Por su parte, los sedimentos se resuspendieron en 15 ml de tampón fosfato sódico (0,2M, pH 5,5), tras lo cual se añadieron 6,6  $\mu$ l/ml de la solución de ácido heptadecanoico. Antes de proceder a la desintegración celular se incorporaron perlas de vidrio (0,45 mm de diámetro) a las suspensiones de los

sedimentos. La desintegración celular se llevó a cabo en un disruptor durante 2 min, con la aplicación cada 10 s de pulsos de CO<sub>2</sub> de 3 s para evitar el sobrecalentamiento de las muestras.

Las isoformas de CLA se extrajeron, junto con todo el material lipídico de las muestras, de acuerdo con el método de Hanson y Olley (1963). Para ello se incorporaron a los sobrenadantes y a los extractos intracelulares obtenidos a partir de los sedimentos, 40 ml de metanol y 20 ml de cloroformo, añadiendo una punta de espátula de butil-hidroxi-tolueno (BHT) como antioxidante. Tras una agitación fuerte durante 3 min en un homogeneizador tipo Polytron, se adicionaron otros 20 ml de cloroformo y 20 ml de agua destilada. Se volvió a agitar durante 1 minuto y las mezclas resultantes se centrifugaron a 3.000 g durante 15 min a 4 °C. Se descartaron las fases superior e intermedia separadas en los tubos y se recogió la inferior, correspondiente a la fracción soluble en cloroformo. Dicha fase se filtró sobre un matraz a través de algodón impregnado con cloroformo/metanol (2/1, v/v) y cubierto con una punta de espátula de sulfato sódico anhidro para eliminar los restos de agua. El disolvente se evaporó a sequedad en un rotavapor con baño a 32 °C. Una vez evaporado el disolvente, el matraz se lavó con 1 ml de hexano para arrastrar el contenido, que se transfirió a un tubo de ensayo de 10x1 cm con tapón de rosca y se secó bajo corriente de nitrógeno.

#### **II.2.2.3. Metilación ácida**

Para la obtención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos, la fracción lipídica extraída se disolvió en 6 ml de metanol con un 10% de HCl (Kishino y col., 2002) y se llevó a un baño a 60 °C durante 20 min (Chin y col., 1992). Transcurrido este tiempo, los tubos se retiraron y se dejaron en reposo en hielo durante 5 min para evitar la hidrólisis de los ésteres metílicos así formados. A continuación se adicionaron 2 ml de una mezcla de agua/hexano (1/1, v/v) y se agitó fuertemente durante 1 minuto (Lin, 2000). Se obtuvieron así dos fases, de las que se recogió la capa superior (que contenía los ésteres metílicos de los ácidos grasos) para su análisis por cromatografía de gases.

#### **II.2.2.4. Análisis cromatográfico de los isómeros de CLA**

La producción de CLA se evaluó mediante el análisis cualitativo y cuantitativo de sus dos principales isómeros *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se inyectaron en una columna Carbowax/BTR (30 m x 0,32 mm). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: tras un periodo inicial isoterma de 140 °C durante 2 min, la temperatura del horno se incrementó hasta 240 °C siguiendo un gradiente de 3 °C/min; la temperatura final se mantuvo durante un período adicional de 15 min. El inyector y el detector se programaron a 250 °C. El volumen de inyección fue de 1 µl y la relación de *split* fue 1:50. Se utilizó helio como gas portador con una presión de cabeza de 11 psi y un flujo de 20 ml/min.

Los isómeros de CLA se identificaron por comparación con los tiempos de retención de patrones analizados en las mismas condiciones. La cuantificación se realizó mediante el método del estándar interno.

#### **II.2.3. Determinación de la producción de AGCC y ácido láctico**

##### **II.2.3.1. Estudio del perfil fermentativo**

Previamente a la determinación de la producción de AGCC y ácido láctico por las cepas bacterianas, se realizó un estudio de su capacidad para fermentar diversos carbohidratos. Para ello se empleó el sistema de galerías de pruebas de fermentación en tiras API 50 CH con 49 azúcares. Una vez revitalizadas, las cepas se cultivaron en caldo MRS a 37 °C durante 16 h, tras lo cual se centrifugaron a 8.000 g durante 10 min. Los sedimentos se resuspendieron en medio API 50 CHL y se transfirieron a los distintos pocillos de las tiras. Éstas se incubaron a 37 °C durante 24 h, transcurridas las cuales se determinó qué carbohidratos fueron fermentados por las bacterias estudiadas mediante la observación del cambio de color.

##### **II.2.3.2. Producción y cuantificación de ácido láctico**

Se utilizó como medio un tampón de bicarbonato sódico con diferentes azúcares que se eligieron en función de los resultados obtenidos en el estudio del perfil fermentativo y por su importancia en los productos lácteos.

En primer lugar, las cepas se revitalizaron mediante tres pases en caldo MRS a 37 °C durante 24-48 h, en condiciones de anaerobiosis. Tras el último pase se tomaron alícuotas de 1 ml del medio de cultivo, que se añadieron a distintos tubos con 9 ml de bicarbonato sódico (150 mmol/l, pH 7,8) (Hove y col., 1994; Arsène-Ploetze y Bringel, 2004). A continuación se adicionó a distintos tubos 0,5 g de cada uno de los azúcares seleccionados (glucosa, fructosa, galactosa o lactosa). Los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 y 48 h en anaerobiosis.

A partir de los medios de incubación, se analizó la concentración de L(+)- y D(-)-ácido láctico mediante un kit enzimático de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se tomaron 100 µl de muestra que se centrifugaron a 12.000 g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a una cubeta de espectrofotometría y se realizó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. La cuantificación se hizo utilizando las dos soluciones patrón de L(+)- y D(-)-ácido láctico del kit enzimático.

### **II.2.3.3. Producción y cuantificación de los AGCC**

#### **II.2.3.3.1. Extracción de los AGCC**

La incubación de las cepas se llevó a cabo del mismo modo que se señala en el apartado II.2.3.2. Una vez finalizada la incubación, se adicionó el estándar interno a las muestras (0,25 ml de una solución acuosa de ácido crotónico al 1%) (Innocente y col., 2000) y se procedió a su centrifugación a 7.000 g durante 10 min a 4 °C. Se tomaron 2 ml del sobrenadante, que se acidificó con HCl 5N hasta pH 3-4 para liberar los ácidos grasos que se encontraban en forma de sales sódicas; a continuación los ácidos grasos se extrajeron con 0,5 ml de éter dietílico. Una vez añadido éste, y tras 20 min de agitación, la mezcla se dejó en reposo, obteniéndose así una fase superior etérea con los AGCC en solución. Por último se adicionó una punta de espátula de sulfato sódico anhidro para retirar los restos de agua del extracto etéreo e inmediatamente se procedió a su análisis en un cromatógrafo de gases.

#### **II.2.3.3.2. Análisis cromatográfico de los AGCC**

El perfil de AGCC se obtuvo mediante inyección de las muestras en una columna FFAP (30 m x 0,53 mm) que se mantuvo inicialmente a 80 °C durante 2

min, tras lo cual la temperatura del horno se aumentó hasta 220 °C a razón de 5 °C/min, finalizando el análisis con un periodo isoterma de 15 min a 220 °C. El inyector y el detector se programaron a 250 °C. El volumen inyectado fue de 1 µl y la relación de *split* fue 1:50. Como gas portador se empleó helio con una presión de cabeza de 15 psi y un flujo de 24 ml/min.

Los distintos ácidos grasos se identificaron por comparación con los tiempos de retención de patrones comerciales analizados en las mismas condiciones. La cuantificación se realizó mediante el método del estándar interno.

#### **II.2.4. Determinación de folatos**

##### **II.2.4.1. Preparación de las muestras**

Los microorganismos se revitalizaron mediante tres pases en caldo MRS a 37 °C durante 24 h. A continuación se inocularon 100 µl de cultivo en 10 ml de caldo MRS suplementado con 100 µM de ácido paraaminobenzoico y 0,8% de NaCl, y ajustando el pH a 6,8 (Sybesma y col., 2003; Jagerstad y col., 2005; Pompei y col., 2007). El ácido paraaminobenzoico se añadió como precursor de la biosíntesis de folatos. Todas las cepas se incubaron en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis a 37 °C durante 24 y 48 h.

##### **II.2.4.2. Extracción de los folatos**

Se determinó la producción de folatos en extractos intra y extracelulares. Tras la incubación de los microorganismos, los medios de cultivo se centrifugaron a 13.000 g durante 10 min a 0 °C (Lin y Young, 2000; Pompei y col., 2007). El sobrenadante se clarificó a través de filtros de 0,45 µm de tamaño de poro, se liofilizó y se conservó en congelación a -80 °C antes de proceder a su análisis. Por su parte, el sedimento resultante de la centrifugación se lavó con 3 ml de tampón fosfato potásico 0,05 M (pH 6,5) y, tras nueva centrifugación a 5.000 g durante 3 min a 0 °C, se resuspendió en un volumen equivalente (1/1, p/v) del mismo tampón (Pompei y col., 2007). Para la obtención del extracto intracelular se tomó 1 ml de esta suspensión, al que se añadieron 0,5 g de perlas de vidrio (0,45 mm de diámetro) para facilitar la desintegración de las células. Ésta se llevó a cabo en un disruptor celular durante 2 min, con la aplicación de pulsos de CO<sub>2</sub> de 3 s cada 10 s para evitar el sobrecalentamiento de las muestras. Los extractos obtenidos se congelaron y se mantuvieron a -80 °C hasta el momento de su análisis.

Todos los extractos se transportaron en congelación (-80 °C) al *University Medical Center* de la *Vrije Universiteit* de Ámsterdam (Holanda), donde se procedió a la identificación y cuantificación de los folatos.

#### **II.2.4.3. Desconjugación de los grupos poliglutamilfolato**

Las muestras se descongelaron y se les adicionó 1 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M con 0,6 mM de ditioneol y 0,2% de mercaptoetanol (pH 7,0). Las mezclas se agitaron durante 15 s bajo corriente de nitrógeno para excluir el oxígeno y se transfirieron a tubos de polipropileno de 15 ml. A continuación, a cada muestra se le añadieron 10 µl de tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,3) con 0,01 unidades de la enzima carboxipeptidasa G. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 90 min en un baño de agua con agitación ocasional (Lin y Young, 2000; Pompei y col., 2007). Todos los procedimientos descritos en este apartado y en los siguientes se realizaron protegiendo los tubos de la luz para evitar la oxidación de los folatos.

#### **II.2.4.4. Desnaturalización proteica**

Una vez finalizada la incubación, los tubos se dejaron reposar en hielo, se les adicionaron 10 ml del tampón de extracción, se excluyó el oxígeno bajo corriente de nitrógeno y se cerraron herméticamente antes de someterlos a ebullición durante 20 min. Tras el calentamiento, los tubos se transfirieron a un baño de hielo donde permanecieron durante 5 min. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 2.000 g durante 10 min a 4 °C (Smith y col., 2006).

#### **II.2.4.5. Separación de los folatos por cromatografía de afinidad**

Se tomaron los sobrenadantes resultantes de la centrifugación y se les adicionaron 10 µl de una solución 3,6 µM de los estándares internos (isótopos estables de  $w^{13}C_5x$ -5-metiltetrahidrofolato,  $w^{13}C_5x$ -5-formiltetrahidrofolato,  $w^{13}C_5x$ -5-meteniltetrahidrofolato y  $wD_4x$ -ácido fólico) con un 0,1% de ácido ascórbico como antioxidante (Kok y col., 2004). A continuación, los sobrenadantes se transfirieron a columnas (1 ml, 30 mg, 30 µm de tamaño de partícula) rellenas de un gel con proteína de unión a folato, que previamente se habían acondicionado con tres lavados con 5 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,0).

Para la separación cromatográfica, cada columna se lavó con 5 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,0) que contenía 1 M de NaCl, seguido de 5 ml de tampón fosfato potásico 0,05 M (pH 7,0) y finalmente 5 ml de tampón fosfato potásico 0,025 M (pH 7,0). Por último, la columna se eluyó dos veces con 5 ml de HCl 0,1 M directamente sobre cartuchos Oasis de equilibrio hidrofílico-lipofílico previamente acondicionados tras un lavado con 2 ml de agua seguido de 2 ml de metanol. El cartucho se lavó con 2 ml de agua MilliQ y se eluyó en un vial de vidrio ámbar de 1,5 ml de capacidad con 1 ml de metanol que contenía 1 µg/ml de butil-hidroxi-anisol (BHA) y 0,5 µg/ml de BHT (Smith y col., 2006).

El metanol empleado como eluyente se evaporó bajo corriente de nitrógeno a 40 °C y el contenido del vial se disolvió en 50 µL de metanol con 1 µg/ml de BHA y 0,5 µg/ml de BHT. Los viales se centrifugaron a 14.000 g durante 5 min a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a placas de poliestireno (10 x 8 cm) de 96 pocillos con capacidad de 800 µl/pocillo, que se colocaron en un inyector automático para su análisis por LC-MS/MS. Se inyectó un volumen de 1 µl de cada muestra.

#### **II.2.4.6. Análisis de los folatos por LC-MS/MS**

El análisis de los distintos folatos se llevó a cabo en una columna Zic-Hilic (150 x 4,6 mm). Se utilizó como fase móvil una mezcla de una solución de acetonitrilo (A) y una solución de acetonitrilo y acetato de amonio 5 mM, 20/80, v/v (B). La columna se equilibró con un 78% de la solución A y un 22% de la solución B durante 10 min. El gradiente de elución se inició transcurridos 4 min desde la inyección, alcanzando en 10 min el 100% de la solución B y manteniéndose estas condiciones durante otros 2 min. El flujo se mantuvo a 0,1 ml/min durante todo el análisis. La columna se conectó a un turbo de ionización por electrospray que, a su vez, estaba conectado a un espectrómetro de masas en tándem triple cuadrupolo. El turbo de ionización por electrospray operó en modo iónico positivo, la temperatura se fijó en 450 °C y el voltaje en 5.000 V. Como gas del turbo iónico (gas de colisión) se utilizó nitrógeno con un flujo de 8 ml/min y la disociación inducida por colisión se inició usando el gas a una presión de 0,06 kPa. La energía de la colisión se fijó a 31 V, el potencial de focalización a 260 V y el de agrupación a 46 V. Todos los experimentos se realizaron utilizando la resolución

unidad. Para cada transición de fragmento del precursor se aplicó un tiempo de retención de 50 ms.

Los folatos se identificaron por comparación con los tiempos de retención y la relación  $m/z$  de los patrones analizados en las mismas condiciones. La cuantificación se realizó mediante el método del estándar interno.

## **II.2.5. Estudio de la producción de oligosacáridos**

### ***II.2.5.1. Análisis de la fracción de GOS***

#### **II.2.5.1.1. Evaluación de la actividad $\beta$ -galactosidasa**

Se determinó la actividad enzimática extracelular, intracelular y ligada a la pared celular en las cepas seleccionadas.

Para llevar a cabo estos estudios, los microorganismos se revitalizaron mediante tres pases en caldo MRS a 37 °C durante 24 h, tras lo cual se transfirieron 100  $\mu$ l del cultivo a un tubo con 10 ml de caldo MRS que se incubó en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis hasta el inicio de la fase estacionaria. Una vez alcanzada ésta, los medios se centrifugaron a 10.000  $g$  durante 10 min a 4 °C (Nguyen y col., 2006). El sobrenadante se utilizó para determinar la actividad  $\beta$ -galactosidasa extracelular, para lo cual se liofilizó y resuspendió en 4 ml de un tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6,5) que contenía 22 mM de orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) (Nguyen y col., 2006), 0,1 mM de EDTA y 0,1 mM de  $MgCl_2$  (Kim y col., 1997; Leahy y col., 2001). La actividad enzimática ligada a la pared celular se determinó en el sedimento, que se resuspendió en 4 ml del mismo tampón. Para evaluar la actividad enzimática intracelular se utilizó otro sedimento que se resuspendió en 4 ml del tampón antes de proceder a su desintegración en un disruptor celular. Ésta se llevó a cabo durante 2 min con aplicación de pulsos de  $CO_2$  de 3 s de duración cada 10 s para evitar el incremento de temperatura durante el proceso.

Todas las muestras se incubaron en agitación a 600 r.p.m. durante 15 min a 37 °C (Kim y col., 1997; Nguyen y col., 2006). La reacción se paró mediante la adición de 1 ml de  $Na_2CO_3$  al 10%. Finalmente, se determinó la concentración de orto-nitrofenol (oNP) liberada por la enzima mediante lectura espectrofotométrica a 420 nm. La cuantificación del producto de la reacción se llevó a cabo utilizando



una recta patrón de oNP, cuya ecuación fue  $y=0,0014x+0,0799$  ( $R^2=0,9958$ ). La unidad de actividad enzimática se estableció como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol/min}$  de oNP en las condiciones descritas.

#### II.2.5.1.2. Producción de GOS por los microorganismos

Como paso previo se activaron la cepas mediante tres pases en caldo MRS adicionado de un 2% de lactosa (Hung y Lee, 1998) y suplementado con 0,6 g/L de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido, para inducir la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa (Tryland y Fiksdal, 1998; Leahy y col., 2001). La lactosa se preparó en una solución al 20% en agua destilada y se esterilizó a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$ . Los microorganismos se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37 °C durante 24 h.

Tras la activación de las cepas, se inoculó 1 ml del cultivo en 100 ml de medio de Hsu y col. (2005) modificado. El medio de Hsu y col. (2005) contiene, por litro, 40 g de glucosa, 35 g de extracto de levadura, 3 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0,3 g de L-Cys, y se ajusta a pH 6,5, lo que favorece la actividad transferasa de la  $\beta$ -galactosidasa (Cruz y col., 1999). Este medio se modificó adicionando un 20% de lactosa (Splechtna y col., 2006). Las muestras se incubaron en anaerobiosis a 37 °C durante 24 h.

Concluido el periodo de incubación, el medio se centrifugó a 8.000  $g$  durante 5 min a 4 °C, seguido de la filtración del sobrenadante (0,45  $\mu\text{m}$ ). Las muestras se congelaron a -80 °C y se transportaron a los laboratorios de Puleva Biotech (Granada) para su análisis.

#### II.2.5.1.3. Análisis de los GOS

La composición de oligosacáridos de las muestras se determinó mediante HPLC utilizando un detector de índice de refracción y una columna MCI GEL (CK08E) (300 x 8,0 mm). Se empleó agua Milli-Q como fase móvil. Las muestras se diluyeron en una proporción 1/25 y se inyectaron 10  $\mu\text{l}$  en el cromatógrafo. La temperatura del detector fue de 50 °C. La columna se mantuvo a temperatura ambiente. El flujo de trabajo fue de 1 ml/min.

Dada la dificultad en la utilización de patrones para el análisis de GOS, en el análisis cromatográfico se asumió como tal fracción todo compuesto con un

tiempo de retención diferente del de glucosa, galactosa y lactosa. Para la cuantificación de los compuestos considerados GOS, se utilizó fructosil-nistosa como patrón. Este procedimiento se apoya en el hecho de que todos los oligosacáridos generan una respuesta similar cuando se detectan por su índice de refracción (Corral, 2005).

#### **II.2.5.2. Estudio de la producción de FOS**

##### **II.2.5.2.1. Evaluación de la actividad fructosiltransferasa**

Dado que la gran mayoría de las fructosiltransferasas microbianas utilizan como aceptor la sacarosa (Velázquez-Hernández y col., 2009), en estas investigaciones se escogió este azúcar para la determinación de esta actividad enzimática.

En primer lugar, las cepas se revitalizaron mediante tres pases en caldo MRS a 37 °C durante 24 h. A continuación, cada cepa se cultivó en tubos con 10 ml de caldo MRS en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis hasta el inicio de la fase estacionaria. Los medios obtenidos se centrifugaron a 10.000 *g* durante 10 min a 4 °C (Nguyen y col., 2006) y se obtuvieron los sobrenadantes y sedimentos correspondientes.

El sobrenadante, que se utilizó para la determinación de la actividad enzimática extracelular, se liofilizó y se resuspendió en 2 ml de tampón acetato sódico 100 mM (pH 5,2) adicionado de 250 mM de sacarosa (van Hijum y col., 2002) y 1 mM de CaCl<sub>2</sub> (Song y Jacques, 1999). Para la determinación de la actividad enzimática ligada a la pared celular se resuspendió el sedimento en 2 ml del mismo tampón. La actividad intracelular se evaluó en un sedimento que, una vez resuspendido en 2 ml del tampón, se sometió a desintegración celular durante 2 min con aplicación de pulsos CO<sub>2</sub> de 3 s de duración cada 10 s para evitar el aumento de temperatura durante el proceso.

La actividad fructosiltransferasa se determinó mediante el método propuesto por Puebla y col. (1999). Este método implica la realización de una doble incubación, la primera para que tenga lugar la actividad de las fructosiltransferasas con la consecutiva síntesis de fructosilsacarosa. La segunda, mediante la adición de una sacarasa a las muestras, tiene como objetivo hidrolizar

la sacarosa residual que puede interferir en la determinación de la actividad fructosiltransferasa.

Así pues, en primer lugar las muestras se incubaron en el tampón a 37 °C durante 4 h, al cabo de la cuales se paró la reacción mediante calentamiento a 100 °C durante 2 min. A continuación, para hidrolizar la sacarosa residual, se tomaron 20 µl de cada muestra y se añadieron a tubos que contenían 0,25U de sacarasa en un volumen final de 0,4 ml de tampón maleato sódico 50 mM (pH 6,5), tras lo que se procedió a su incubación a 40 °C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron alícuotas que se calentaron durante 10 min a 100 °C en un volumen final de 250 µL de NaOH 0,4M, con el fin de destruir la glucosa y fructosa resultantes de la hidrólisis.

Para determinar la cantidad de fructosilsacarosa formada se añadieron 0,6 ml de una solución fresca de TBA-HCl, tras lo cual las muestras se calentaron a 100 °C durante 7 min. Una vez enfriadas, se midió la absorbancia de las soluciones a 432 nm frente a un blanco, preparado de igual forma que las muestras, pero sin la adición de sacarosa. La unidad de actividad fructosiltransferasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento de 0,1 unidades de absorbancia a 432 nm.

#### II.2.5.2.2. Producción de FOS por los microorganismos

Las cepas se activaron mediante tres pases en caldo MRS modificado según Stolz y col. (1995), a 37 °C durante 24 h en anaerobiosis. Para ello se adicionaron al medio de cultivo 5 g/l de fructosa, 5 g/l de glucosa y 10 g/l de sacarosa. Los azúcares incorporados procedían de soluciones acuosas de 50 g/l de fructosa y glucosa y de 100 g/l de sacarosa, que se esterilizaron a través de filtros de 0,45 µm antes de su adición al caldo.

Una vez activadas las cepas, se tomó 1 ml del cultivo, que se inoculó en 100 ml de caldo MRS (pH 5,8) adicionado de 200 g/l de sacarosa y 15 g/l de fructosa (Korakli y col., 2003). Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 h en anaerobiosis (Van Geel-Schutten y col., 1998; Korakli y col., 2003).

Concluido el periodo de incubación, el medio se centrifugó a 8.000 g durante 5 min a 4 °C, seguido de una filtración del sobrenadante (0,45µm). Las

muestras se congelaron a -80 °C y se transportaron a los laboratorios de Puleva Biotech (Granada) para su análisis.

#### II.2.5.2.3. Análisis de los FOS

La composición de FOS de las muestras se determinó mediante HPLC utilizando un detector de índice de refracción y una columna C18 Luna (NH<sub>2</sub>) Amino (250 x 4,6 mm y 5 µm de tamaño de partícula). Se utilizó como fase móvil una mezcla agua/acetonitrilo (20/80, v/v). El volumen de inyección fue de 20 µl. El flujo de trabajo fue de 3 ml/min.

La identificación de fructosa, glucosa, sacarosa, 1-kestosa, nistosa y 1-β-fructofuranosil nistosa se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención de los picos cromatográficos obtenidos con los de una solución 5 µM de cada patrón. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método del estándar externo.

#### II.2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa informático Statgraphics Plus version 5.0 (Manugistics, MD, USA). Se calcularon las medias y las desviaciones estándar de los resultados obtenidos y se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA). Cuando se obtuvieron diferencias significativas entre las medias, éstas se compararon utilizando el test de Tukey.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



### III.1. Estudio de la producción de poliaminas y aminos biógenas

#### III.1.1. Producción de poliaminas

En la Tabla 4 se recogen los resultados relativos a la producción de poliaminas por las distintas cepas estudiadas.

Como se puede observar, la tensión de oxígeno influyó de forma notable en la cantidad total y en el perfil de poliaminas obtenido para cada cepa. En el caso de las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus*, la mayor producción de poliaminas se observó cuando éstas se incubaron en condiciones de anaerobiosis. En estudios con *Lactobacillus hilgardii* y *Lactobacillus plantarum*, Arena y Manca de Nadra (2001) observaron una mayor producción de putrescina en condiciones de microaerofilia que en anaerobiosis. Por lo que se refiere a las cepas del género *Enterococcus*, el comportamiento en relación con la tensión de oxígeno no fue uniforme, de modo que *Enterococcus faecalis* LM18 y *Enterococcus faecium* LJx4 produjeron más poliaminas en aerobiosis, mientras que el resto de las cepas rindieron mayor cantidad en anaerobiosis.

*E. faecalis* LM24 fue la cepa que produjo una mayor cantidad de poliaminas, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Las cepas LM14 y LM18 de esta misma especie rindieron de 2 a 5 veces menos poliaminas que la cepa LM24, dependiendo de la tensión de oxígeno del medio. Por otra parte, de las cinco cepas de *Lactobacillus gasseri* que se estudiaron, la mayor productora de poliaminas fue la LM21, sobre todo en anaerobiosis. Esta variación entre cepas de la misma especie ha sido observada por otros autores (Bover-Cid y Holzapfel, 1999; Leuschner y col., 1999), lo que confirmaría la hipótesis de que la producción de aminos es una característica propia de cada cepa, más que específica de especie.

Por lo que se refiere al género *Bifidobacterium*, las cepas ensayadas apenas produjeron poliaminas (Tabla 2). Que el autor sepa, no existen datos en la bibliografía sobre la producción de poliaminas en medios de cultivo por bacterias de este género. Sin embargo sí existen estudios clínicos al respecto. Así por ejemplo, Linsalata y col. (2005) encontraron una reducción en los niveles de poliaminas en la mucosa del colon de ratas cuya dieta se suplementó con una mezcla de bacterias probióticas, entre ellas cepas del



género *Bifidobacterium*. Por el contrario, Matsumoto y Benno (2004) observaron un aumento considerable de los niveles de espermidina en heces de individuos adultos sanos alimentados con yogur al que se añadió *Bifidobacterium lactis* LKM512.

La poliamina que las cepas sintetizaron en mayor cantidad fue, en general, la espermidina, aunque *E. faecalis* LM24 produjo mayoritariamente espermina (Tabla 4). Aunque los datos recopilados en la bibliografía son bastante variables dependiendo de la cepa estudiada y de la composición del medio, se puede decir que de un modo general, las concentraciones de putrescina y espermina obtenidas en el presente trabajo son similares a las observadas por Hamana y col. (1989) y Arena y Manca de Nadra (2001), en cepas de *Lactobacillus* sp. En cualquier caso, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el perfil de producción de poliaminas de una cepa es diferente según la incubación se lleve a cabo en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis. Así por ejemplo, *E. faecalis* LM24, que produjo similares concentraciones de poliaminas en ambas condiciones experimentales, originó un 63% de espermina en aerobiosis, frente a un 38% en anaerobiosis. Este mismo comportamiento se observó en todas las cepas de *Enterococcus* estudiadas.

Los niveles de espermina producidos por *E. faecalis* LM24 son superiores a los recogidos en la bibliografía en estudios en medios de cultivo (Hamana y col., 1989). Esta mayor producción es interesante ya que la espermina parece ser la poliamina más activa en el control de varios procesos biológicos y, por ejemplo, se ha señalado que presenta un papel más relevante en la regulación de la actividad ODC que otras poliaminas (Yuan y col., 2001). La mayor actividad biológica se ha atribuido a su carga eléctrica, que determina las interacciones con los componentes celulares cargados negativamente (ADN, ARN, proteínas, etc.).

Tabla 4. Producción de poliaminas (nmol/ml) por las bacterias seleccionadas.

Microorganismo	Putrescina		Espermidina		Espermina		Poliaminas totales	
	Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis	Aerobiosis	Anaerobiosis
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	1,1 <sup>c,β</sup>	5,7 <sup>b,α</sup>	3,8 <sup>b,β</sup>	5,1 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	0,2 <sup>e,α</sup>	4,8 <sup>c,β</sup>	11,1 <sup>c,α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	nd <sup>β</sup>	1,4 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	7,4 <sup>b,c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	6,0 <sup>b,α</sup>	nd <sup>β</sup>	14,8 <sup>c,α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM19	1,1 <sup>c</sup>	1,4 <sup>c</sup>	nd	nd	nd <sup>β</sup>	2,0 <sup>c,α</sup>	1,1 <sup>e,β</sup>	3,3 <sup>f,α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	2,9 <sup>a,α</sup>	1,7 <sup>c,β</sup>	2,3 <sup>c,β</sup>	13,7 <sup>a,α</sup>	nd <sup>β</sup>	3,3 <sup>c,α</sup>	5,2 <sup>c,β</sup>	18,7 <sup>b,α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM22	nd	nd	0,7 <sup>d,β</sup>	2,1 <sup>d,α</sup>	0,2 <sup>d,α</sup>	nd <sup>β</sup>	0,9 <sup>e,β</sup>	2,1 <sup>f,α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> HLM24	nd <sup>β</sup>	0,1 <sup>e,α</sup>	2,7 <sup>b,c,β</sup>	4,5 <sup>c,d,α</sup>	0,4 <sup>d</sup>	0,3 <sup>e</sup>	3,0 <sup>d,β</sup>	4,9 <sup>e,α</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	nd <sup>β</sup>	1,5 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	2,9 <sup>d,α</sup>	nd <sup>β</sup>	2,3 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	6,7 <sup>d,α</sup>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	0,1 <sup>d,α</sup>	nd <sup>β</sup>	nd <sup>β</sup>	4,6 <sup>c,d,α</sup>	nd <sup>β</sup>	1,1 <sup>d,α</sup>	0,1 <sup>f,β</sup>	5,7 <sup>d,e,α</sup>
<i>Lactobacillus curvatus</i> NCFB 2739	nd	nd	2,0 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	nd <sup>β</sup>	2,7 <sup>c,α</sup>	2,0 <sup>d</sup>	2,7 <sup>f</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM18	1,9 <sup>b</sup>	1,4 <sup>c</sup>	6,4 <sup>a,α</sup>	3,3 <sup>d,β</sup>	1,2 <sup>c,α</sup>	0,4 <sup>e,β</sup>	9,5 <sup>b,α</sup>	5,0 <sup>e,β</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	2,9 <sup>a,β</sup>	8,1 <sup>a,α</sup>	5,5 <sup>a,β</sup>	8,0 <sup>b,α</sup>	14,2 <sup>a,α</sup>	9,9 <sup>a,β</sup>	22,6 <sup>a,β</sup>	25,9 <sup>a,α</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	0,2 <sup>d</sup>	0,3 <sup>e</sup>	3,0 <sup>b,β</sup>	5,5 <sup>c,α</sup>	5,9 <sup>b,α</sup>	1,2 <sup>b,β</sup>	9,0 <sup>b,α</sup>	6,9 <sup>d,β</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	1,0 <sup>c</sup>	0,7 <sup>d</sup>	1,0 <sup>d,β</sup>	9,1 <sup>b,α</sup>	5,2 <sup>b,α</sup>	2,5 <sup>c,β</sup>	7,2 <sup>b,c,β</sup>	12,3 <sup>c,α</sup>
<i>Bifidobacterium breve</i> CECT 4839	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd
<i>Bifidobacterium infantis</i> CECT 4552	-	nd	-	0,1 <sup>e</sup>	-	nd	-	0,1 <sup>g</sup>
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CECT 5776	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd
<i>Staphylococcus epidermidis</i> LM10	nd	nd	nd	0,3 <sup>e</sup>	nd	nd	nd <sup>β</sup>	0,3 <sup>g,α</sup>

nd: no se detectó producción de poliaminas

(-) las cepas de *Bifidobacterium* sp. sólo se cultivaron en anaerobiosis

a,b,c,d,e,f,g: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

α,β: medias entre dos columnas con distinto superíndice para la misma amina difieren significativamente ( $p<0,05$ )

### III.1.2. Producción de otras aminas

Debido a su importancia para la salud pública y a que también pueden ser sintetizadas por bacterias, en el presente trabajo se evaluó la capacidad de las cepas para producir otras aminas que se encuadrarían bajo la denominación tradicional de “aminas biógenas”.

En la Tabla 5 se muestra la producción de triptamina, 2-feniletilamina, histamina, cadaverina y tiramina por las diferentes cepas estudiadas. La mayor síntesis de aminas biógenas correspondió a *Lactobacillus fermentum* LC40, destacando la producción de 2-feniletilamina y cadaverina, con valores superiores a 30 nmol/ml. Esta cepa, en cambio, no produjo histamina.

Las concentraciones de triptamina e histamina detectadas en este trabajo fueron bajas, con valores inferiores a 5,4 nmol/ml y 4,2 nmol/ml, respectivamente. Por su parte, 2-feniletilamina, cadaverina y tiramina se sintetizaron en mayor o menor cantidad dependiendo de las condiciones de incubación. Así, excepto en el caso de *Staphylococcus epidermidis* LM10, la cadaverina se produjo en mayor cantidad cuando las cepas se incubaron en condiciones de anaerobiosis, mientras que la tiramina se sintetizó casi únicamente cuando los microorganismos se cultivaron en aerobiosis. Los niveles de cadaverina detectados en este trabajo son similares a los obtenidos en medios de cultivo por Hamana y col. (1989) y Bover-Cid y Holzapfel (1999) en cepas del género *Lactobacillus*.

Según los datos recogidos en la bibliografía, la producción de tiramina es altamente dependiente de la cepa. En el presente trabajo, la máxima concentración detectada fue de 15,2 nmol/ml, equivalentes a 2,3 mg/l. En estudios con cepas seleccionadas de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus*, Leuschner y col. (1998a,b; 1999) y Moreno-Arribas y col. (2000) no observaron producción de tiramina en todas ellas, aunque las que resultaron positivas sintetizaron cantidades muy superiores a las obtenidas en este estudio, llegando a ser del orden de g/l. Por su parte, Bover-Cid y Holzapfel (1999) sí detectaron producción de tiramina en todas las cepas de lactobacilos ensayadas, también con niveles superiores a los observados en estas investigaciones.

En relación con la histamina, Hamana y col. (1989) no detectaron producción de esta amina en ninguna de las cepas de *Lactobacillus* sp. ensayadas, mientras que Bover-Cid y Holzapfel (1999) sólo detectaron su producción en una cepa de *Lactobacillus acidophilus* y otra de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que rindieron concentraciones del orden de 20 mg/l, muy superiores a los máximos niveles obtenidos en el presente trabajo.

Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, es de especial interés evitar la ingesta de concentraciones elevadas de tiramina e histamina, por sus efectos vaso y psicoactivos. Para estas aminas se han descrito como umbrales de toxicidad ingestas de 10-80 mg y 70-1000 mg, respectivamente, en personas sensibles (Renner, 1987). En individuos sanos se han sugerido límites superiores a estos (Ten Brink y col., 1990). Aunque las bacterias estudiadas en este trabajo no se hayan probado en alimentos, es posible hacer alguna consideración desde el punto de vista toxicológico teniendo en cuenta los datos que se recogen en la bibliografía. Así por ejemplo, Leuschner y col. (1998b), empleando para la elaboración de queso Gouda una cepa de *Lactobacillus brevis* que presentó *in vitro* una producción de tiramina superior a 5 mg/ml, obtuvieron en queso tras 12 semanas de maduración concentraciones de 776 mg/kg. Una ración de este queso (aproximadamente 100 g), proporcionaría por lo tanto una ingesta de 77 mg de tiramina, valor que se encuentra dentro de los límites del umbral de toxicidad antes mencionados. Estos mismos autores, inoculando una cepa de *Lactobacillus buchneri* cuya producción de tiramina fue inferior a 5 mg/ml, no detectaron esta amina en el queso durante la maduración. Así pues, teniendo en cuenta que la cepa que más tiramina produjo entre todas las estudiadas en el presente trabajo rindió *in vitro* 0,0023 mg/ml, en principio no cabría esperar ningún problema derivado de su empleo en alimentos.

Tabla 5. Producción de aminas biógenas (nmol/ml) por las bacterias seleccionadas.

Microorganismo	Triptamina		Feniletilamina		Histamina		Cadaverina		Tiramina		Total	
	Aero	Anaero	Aero	Anaero	Aero	Anaero	Aero	Anaero	Aero	Anaero	Aero	Anaero
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	5,4 <sup>a,α</sup>	2,6 <sup>b,β</sup>	36,2 <sup>a,α</sup>	2,7 <sup>c,β</sup>	nd	nd	32,3 <sup>a</sup>	35,1 <sup>a</sup>	5,4 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	79,3 <sup>a,α</sup>	40,4 <sup>a,β</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	nd	nd	nd	nd	nd <sup>β</sup>	1,6 <sup>a,α</sup>	nd	nd	nd	nd	nd <sup>β</sup>	1,6 <sup>g,α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM19	nd	nd	0,8 <sup>d,β</sup>	2,6 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	1,3 <sup>a,b,α</sup>	0,8 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	4,3 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	5,9 <sup>e,α</sup>	3,9 <sup>f,β</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	nd	nd	nd	nd	nd <sup>β</sup>	0,5 <sup>c,α</sup>	nd	nd	14,7 <sup>a,α</sup>	nd <sup>β</sup>	14,7 <sup>c,α</sup>	0,5 <sup>h,β</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM22	nd	nd	9,1 <sup>b</sup>	10,6 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9,1 <sup>d</sup>	10,6 <sup>d</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> HLM24	nd <sup>β</sup>	1,4 <sup>b,c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	1,4 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	1,8 <sup>a,α</sup>	nd <sup>β</sup>	12,2 <sup>c,α</sup>	nd	nd	nd <sup>β</sup>	16,7 <sup>c,α</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	nd <sup>β</sup>	2,0 <sup>b,α</sup>	nd	nd	nd	nd	nd <sup>β</sup>	25,7 <sup>b,α</sup>	0,7 <sup>d,α</sup>	nd <sup>β</sup>	0,7 <sup>f,β</sup>	27,7 <sup>b,α</sup>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	nd	nd	0,3 <sup>e,α</sup>	nd <sup>β</sup>	3,0 <sup>b,α</sup>	nd <sup>β</sup>	nd	nd	8,5 <sup>b,α</sup>	nd <sup>β</sup>	11,8 <sup>c,d,α</sup>	nd <sup>β</sup>
<i>Lactobacillus curvatus</i> NCFB 2739	0,9 <sup>b,α</sup>	nd <sup>β</sup>	5,8 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	1,4 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	nd	nd	4,8 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	12,8 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM18	nd	nd	1,8 <sup>d,β</sup>	4,8 <sup>b,α</sup>	4,2 <sup>a,α</sup>	0,9 <sup>b,c,β</sup>	nd	nd	14,3 <sup>a,α</sup>	nd <sup>β</sup>	20,3 <sup>b,α</sup>	5,7 <sup>e,β</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	nd	nd	nd <sup>β</sup>	2,0 <sup>c,α</sup>	nd	nd	nd	nd	1,3 <sup>d,α</sup>	0,2 <sup>a,β</sup>	1,3 <sup>f</sup>	2,1 <sup>g</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5,5 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	5,5 <sup>e,α</sup>	nd <sup>β</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	nd <sup>β</sup>	2,4 <sup>b,α</sup>	2,0 <sup>d,α</sup>	nd <sup>β</sup>	2,6 <sup>b,α</sup>	nd <sup>β</sup>	nd	nd	15,2 <sup>a,α</sup>	nd <sup>β</sup>	19,7 <sup>b,α</sup>	2,4 <sup>g,α</sup>
<i>Bifidobacterium breve</i> CECT 4839	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd	-	nd
<i>Bifidobacterium infantis</i> CECT 4552	-	0,4 <sup>c</sup>	-	5,1 <sup>b</sup>	-	nd	-	24,6 <sup>b</sup>	-	nd	-	30,2 <sup>b</sup>
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> CECT 5776	-	3,7 <sup>a</sup>	-	nd	-	nd	-	1,6 <sup>d</sup>	-	nd	-	5,2 <sup>e</sup>
<i>Staphylococcus epidermidis</i> LM10	nd	nd	4,4 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	0,4 <sup>d,α</sup>	nd <sup>β</sup>	12,2 <sup>b,α</sup>	nd <sup>β</sup>	5,2 <sup>c,α</sup>	nd <sup>β</sup>	22,1 <sup>b,α</sup>	nd <sup>β</sup>

nd: no se detectó producción de aminas biogénas

(-) las cepas de *Bifidobacterium* sp. sólo se cultivaron en anaerobiosis

a,b,c,d,e,f,g,h: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p < 0,05$ )

α,β: medias entre dos columnas con distinto superíndice para la misma amina difieren significativamente ( $p < 0,05$ )

### III.2. Producción de ácido linoleico conjugado

Se estudió la producción intracelular y extracelular de ácido linoleico conjugado (CLA) por las 8 cepas que presentaron los mejores resultados en la síntesis de poliaminas. Todos los estudios posteriores se realizaron con estas mismas cepas: 5 *Lactobacillus* sp. y 3 *Enterococcus* sp.

En la Figura 8 se muestra la producción total de CLA en las distintas condiciones ensayadas. Como se puede apreciar, en general, la mayor síntesis tuvo lugar en anaerobiosis. En la mayoría de las cepas se registró una producción neta de este compuesto, si bien en algunos casos no sólo no se observó producción, sino que por el contrario, los microorganismos utilizaron el CLA en su metabolismo. Un factor que influye en la síntesis o consumo de CLA es la fase de la curva de crecimiento en la que se encuentra la cepa (Kim, 2003; Lee y col., 2003a,b; Oh y col., 2003; Rodríguez-Alcalá y col., 2011). La cantidad de sustrato disponible y el pH del medio también pueden influir en la producción de CLA (Kim, 2003; Lee y col., 2003a,b).

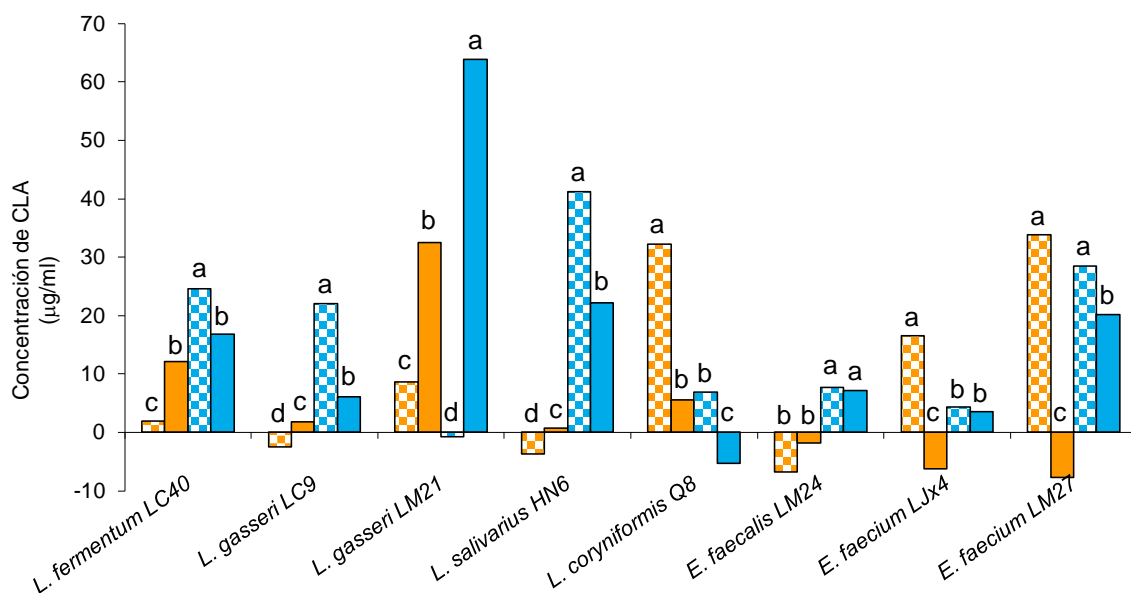


Figura 8. Producción total o consumo (µg/ml) de ácido linoleico conjugado por las bacterias seleccionadas en aerobiosis 24 (■) y 48 h (■) y en anaerobiosis 24 (■) y 48 h (■). a,b,c,d: columnas con distinta letra para cada cepa difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

En las Tablas 6 y 7 se recoge la producción intracelular y extracelular de los dos principales isómeros en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, respectivamente. El isómero mayoritario en todas las cepas fue el *cis*-9, *trans*-11, que es el que principalmente se relaciona con los efectos beneficiosos del CLA en el organismo (Pariza, 2004; Collomb y col., 2006). Este isómero fue también el detectado en mayor cantidad por Alonso y col. (2003) en cepas de *L. acidophilus* y *Lactobacillus casei*.

En cuanto al tiempo de incubación, se observaron distintos perfiles de producción de CLA, independientemente de la tensión de oxígeno del medio. Así, algunas cepas como *Lactobacillus coryniformis* Q8 y *E. faecium* LM27 mostraron la máxima producción tras 24 h de incubación, mientras que otras bacterias, como *L. gasseri* LM21 registraron la mayor producción al cabo de 48 h. Por lo que se refiere al tipo de producción (intra o extracelular), no se observaron patrones definidos.

La cepa que produjo la mayor cantidad total de CLA fue *L. gasseri* LM21, cuando se incubó en condiciones de anaerobiosis durante 48 h (Tabla 7), presentando una producción total de 64,0 µg/ml. En estas condiciones, el 95% (60,7 µg/ml) de la producción fue intracelular y la mayoría (93%) correspondió al isómero *cis*-9, *trans*-11. *Lactobacillus salivarius* HN6 produjo un total de 41,2 µg/ml de CLA a las 24 h de incubación, también en condiciones de anaerobiosis; su origen fue casi exclusivamente intracelular, con un 80% del isómero *cis*-9, *trans*-11. Ogawa y col. (2005) señalan que la producción de CLA por las bacterias lácticas es principalmente intracelular. Las concentraciones de CLA obtenidas en el presente trabajo son inferiores a las observadas por Alonso y col. (2003), quienes señalaron una producción entre 61 y 132 µg/ml en un estudio con cuatro cepas de *L. acidophilus* y *L. casei* tras 24 h de incubación en aerobiosis. Por otra parte, Rodríguez-Alcalá y col. (2011) obtuvieron en cepas de *L. acidophilus* niveles inferiores (3,89 y 8,57 µg/ml de CLA) a los observados en este estudio.

La producción extracelular tiene interés no sólo para la elaboración de alimentos ricos en CLA, sino también desde el punto de vista de su posible síntesis *in situ* en el intestino tras la colonización del mismo por las bacterias (Kamlage y col., 2000; Lee y col., 2007). Cuando se incubó en aerobiosis, *E.*

*faecium* LM27 fue la cepa que produjo la mayor cantidad de CLA extracelular (37,5 µg/ml) en 24 h, correspondiendo un 70% a la isoforma *cis*-9, *trans*-11 y un 30% al isómero *trans*-10, *cis*-12 (Tabla 6). *L. coryniformis* Q8 y *L. gasseri* LM21 también produjeron cantidades importantes de CLA extracelular en aerobiosis a las 24 y 48 h, respectivamente.

Si bien ya se ha mencionado que el isómero *cis*-9, *trans*-11 fue el mayoritario, algunas cepas produjeron cantidades significativas de la isoforma *trans*-10, *cis*-12. La importancia de este isómero ha ido en aumento debido a su relación con la disminución de la grasa corporal (Simon y col., 2005; Park y Pariza, 2007) y con la inhibición de la carcinogénesis en modelos animales (Pariza y col., 2001; Ewaschuk y col., 2006). Según se puede observar en las Tablas 6 y 7, *L. coryniformis* Q8 y *L. gasseri* LM21 en aerobiosis, *L. gasseri* LC9 en anaerobiosis y *E. faecium* LM27 en ambas condiciones, produjeron entre 11 y 14 µg/ml del isómero *trans*-10, *cis*-12, lo que representa entre el 34% y el 55% del total del CLA que sintetizaron estas cepas. Es de destacar que esta producción fue extracelular. Las concentraciones obtenidas son similares a las señaladas por Alonso y col. (2003).



Tabla 6. Producción ( $\mu\text{g/ml}$ ) de los isómeros *cis*-9, *trans*-11 (c9:t11) y *trans*-10, *cis*-12 (t10:c12) de ácido linoleico conjugado (CLA) por las bacterias seleccionadas en condiciones de aerobiosis.

Microorganismo	24 horas					48 horas				
	Extracelular		Intracelular		Total	Extracelular		Intracelular		Total
	c9:t11	t10:c12	c9:t11	t10:c12		c9:t11	t10:c12	c9:t11	t10:c12	
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	0,9 <sup>e</sup>	-1,6 <sup>d</sup>	3,4 <sup>b</sup>	-0,7	2,0 <sup>d,β</sup>	8,1 <sup>b</sup>	6,0 <sup>b</sup>	1,1 <sup>b</sup>	-3,0	12,2 <sup>b,α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	0,7 <sup>e</sup>	-0,8 <sup>d</sup>	0,6 <sup>c</sup>	-3,0	-2,5 <sup>e,β</sup>	-1,0 <sup>d</sup>	-2,7 <sup>d</sup>	7,3 <sup>a</sup>	-1,9	1,7 <sup>d,α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	6,6 <sup>d</sup>	4,4 <sup>b</sup>	0,3 <sup>c</sup>	-2,7	8,6 <sup>c,β</sup>	20,1 <sup>a</sup>	14,2 <sup>a</sup>	1,1 <sup>b</sup>	-2,8	32,6 <sup>a,α</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	1,4 <sup>e</sup>	-1,7 <sup>d</sup>	-0,5 <sup>d</sup>	-2,9	-3,7 <sup>e,β</sup>	6,5 <sup>b</sup>	-0,6 <sup>d</sup>	-1,7 <sup>d</sup>	-3,4	0,8 <sup>d,α</sup>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	19,2 <sup>b</sup>	12,0 <sup>a</sup>	2,8 <sup>b</sup>	-1,8	32,2 <sup>a,α</sup>	2,2 <sup>c</sup>	0,0 <sup>c</sup>	6,5 <sup>a</sup>	-3,1	5,6 <sup>c,β</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	-0,2 <sup>f</sup>	-2,2 <sup>d</sup>	-1,2 <sup>d</sup>	-3,2	-6,8 <sup>e</sup>	2,7 <sup>c</sup>	-1,0 <sup>d</sup>	-0,6 <sup>d</sup>	-2,8	-1,7 <sup>e</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	12,0 <sup>c</sup>	2,1 <sup>c</sup>	5,2 <sup>a</sup>	-2,9	16,4 <sup>b,α</sup>	-1,1 <sup>d</sup>	-3,1 <sup>d</sup>	0,3 <sup>c</sup>	-2,3	-6,2 <sup>e,β</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	26,1 <sup>a</sup>	11,4 <sup>a</sup>	-0,6 <sup>d</sup>	-3,0	33,9 <sup>a,α</sup>	-0,6 <sup>d</sup>	-2,1 <sup>d</sup>	-1,7 <sup>d</sup>	-3,4	-7,8 <sup>e,β</sup>

Los valores con símbolo negativo indican que los microorganismos consumieron CLA

a,b,c,d,e,f: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

$\alpha,\beta$ : medias entre valores de producción total con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

Tabla 7. Producción (µg/ml) de los isómeros *cis*-9, *trans*-11 (c9:t11) y *trans*-10, *cis*-12 (t10:c12) de ácido linoleico conjugado (CLA) por las bacterias seleccionadas en condiciones de anaerobiosis.

Microorganismo	24 horas					48 horas				
	Extracelular		Intracelular		Total	Extracelular		Intracelular		Total
	c9:t11	t10:c12	c9:t11	t10:c12		c9:t11	t10:c12	c9:t11	t10:c12	
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	11,2 <sup>a,b</sup>	2,2 <sup>b</sup>	13,9 <sup>b</sup>	-2,8 <sup>c</sup>	24,5 <sup>b,α</sup>	13,4 <sup>a</sup>	7,6 <sup>a</sup>	-1,1 <sup>d</sup>	-3,1 <sup>b</sup>	16,8 <sup>b,β</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	12,4 <sup>a</sup>	12,1 <sup>a</sup>	-0,1 <sup>f</sup>	-2,4 <sup>c</sup>	22,0 <sup>b,α</sup>	9,7 <sup>a</sup>	-2,6 <sup>c</sup>	1,7 <sup>c</sup>	-2,7 <sup>b</sup>	6,1 <sup>c,β</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	0,3 <sup>c</sup>	-0,5 <sup>d</sup>	1,1 <sup>e</sup>	-1,7 <sup>c</sup>	-0,8 <sup>d,β</sup>	3,3 <sup>d</sup>	0,0 <sup>c</sup>	56,2 <sup>a</sup>	4,5 <sup>a</sup>	64,0 <sup>a,α</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	0,0 <sup>d</sup>	-2,8 <sup>d</sup>	33,0 <sup>a</sup>	10,8 <sup>a</sup>	41,2 <sup>a,α</sup>	7,4 <sup>b,c</sup>	-0,2 <sup>c</sup>	17,0 <sup>b</sup>	-2,0 <sup>b</sup>	22,2 <sup>b,β</sup>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	7,6 <sup>b</sup>	0,2 <sup>c</sup>	1,7 <sup>e</sup>	-2,7 <sup>c</sup>	6,8 <sup>c,α</sup>	0,5 <sup>e</sup>	-2,4 <sup>c</sup>	-0,4 <sup>d</sup>	-3,0 <sup>b</sup>	-5,3 <sup>e,β</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	-0,2 <sup>e</sup>	-2,0 <sup>d</sup>	6,6 <sup>c</sup>	3,2 <sup>b</sup>	7,6 <sup>c</sup>	5,8 <sup>c,d</sup>	0,6 <sup>b</sup>	2,1 <sup>c</sup>	-1,4 <sup>b</sup>	7,1 <sup>c</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	-0,8 <sup>e</sup>	-2,5 <sup>d</sup>	3,2 <sup>d</sup>	4,4 <sup>b</sup>	4,3 <sup>c</sup>	5,2 <sup>c,d</sup>	0,9 <sup>b</sup>	-0,3 <sup>d</sup>	-2,3 <sup>b</sup>	3,5 <sup>d</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	15,2 <sup>a</sup>	11,3 <sup>a</sup>	2,8 <sup>d,e</sup>	-0,9 <sup>c</sup>	28,4 <sup>b,α</sup>	16,8 <sup>a</sup>	7,7 <sup>a</sup>	-1,0 <sup>d</sup>	-3,3 <sup>b</sup>	20,2 <sup>b,β</sup>

Los valores con símbolo negativo indican que los microorganismos consumieron CLA

a,b,c,d,e,f: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

α,β: medias entre valores de producción total con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

### **III.3. Producción de ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta**

Previamente se investigó el perfil fermentativo de las cepas seleccionadas, con el objeto de emplear los sustratos más adecuados para conseguir la máxima producción de ácidos orgánicos. La Tabla 8 muestra los principales azúcares sobre los que mostraron actividad fermentativa las distintas cepas. Todas ellas fermentaron intensamente galactosa, glucosa, fructosa, manosa, maltosa, lactosa y sacarosa. Estas observaciones coinciden de un modo general con los datos recogidos en la bibliografía (Elotmani y col., 2002; Delgado y Mayo, 2004), si bien algunos autores han señalado que ciertas cepas de *L. gasserii* no son capaces de fermentar la lactosa (Martín y col., 2005a).

En función del perfil obtenido y del tipo de carbohidrato, se seleccionaron lactosa, fructosa, galactosa y glucosa como sustratos para la producción de ácidos grasos de cadena corta y ácido láctico.

#### **III.3.1. Producción de ácido láctico**

En las Tablas 9-12 se recogen los resultados de la producción de los isómeros D(-) y L(+) del ácido láctico. Las concentraciones máximas totales se observaron a las 48 h de incubación, con valores que oscilaron entre 37 y 41 g/l para todas las cepas e independientemente del azúcar utilizado como sustrato. El rendimiento final de ácido láctico osciló entre 0,7 y 0,8 g/g. En las primeras 24 h, la producción de ambos isómeros fue en torno a un 40-60% de la que se detectó al final de la incubación.

Además de las características intrínsecas del microorganismo, la concentración de ácido láctico producida en la fermentación se relaciona con el tipo de azúcar y la cantidad que se incorpora al medio. La adición de elevadas concentraciones de azúcar no implica necesariamente la acumulación de una gran cantidad de ácido láctico, ya que en ello influye el perfil fermentativo del microorganismo. No obstante, en las bacterias homofermentativas, es de esperar un rendimiento superior a 0,7 g/g y, por lo tanto, la acumulación de una elevada cantidad de ácido láctico si se parte de concentraciones de azúcares como las que se emplearon en el presente trabajo (50 g/l). Yun y col. (2003), en

Tabla 8. Perfil fermentativo de las bacterias seleccionadas.

Microorganismo	ARA	RIB	GAL	GLU	FRU	MAN	MOL	SOR	NAG	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	MEC	RAF	GEN	TAG
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	-	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	++	++	++	++	-	-	++	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	-	-	++	++	++	++	-	-	++	++	++	++	++	-	++	++	-	-	++	++
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	-	++	++	-	-	++	-
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++	+	-
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	++	++	++	++	++	++	++	-	++	++	++	++	++	-	++	+	-	-	+	-
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++	+	++	-	++	++
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	++	++	++	++	++	++	++	-	+	+	++	++	++	+	++	++	-	-	+	-
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	++	++	++	++	++	++	+	-	++	++	++	++	++	-	++	++	-	-	++	-

- negativa; + moderada; ++ intensa

ARA: L-arabinosa; RIB: ribosa; GAL: galactosa; GLU: D-glucosa; FRU: D-fructosa; MAN: D-manosa; MOL: manitol; SOR: sorbitol; NAG: N-acetilglucosamina; SAL: salicina; CEL: celobiosa; MAL: maltosa; LAC: lactosa; MEL: melibiosa; SAC: sacarosa; TRE: trealosa; MEC: melecitosa; RAF: D-rafinosa; GEN: b-gentibiosa; TAG: tagatosa

ensayos con *E. faecalis* incubado con diferentes azúcares en una concentración de 30 g/l, obtuvo desde 1,3 a 18,2 g/l de ácido láctico tras 24 h de incubación. Estos autores observaron que *E. faecalis* metabolizaba la lactosa y la galactosa por la vía heterofermentativa, produciendo sobre todo ácido acético y ácido fórmico, y con un rendimiento para el ácido láctico inferior a 0,1 g/g. Ninguna de las cepas de *Enterococcus* ensayadas en el presente estudio presentó este comportamiento, ya que el rendimiento con estos dos azúcares fue superior a 0,3 y 0,7 g/g a las 24 y 48 h, respectivamente, y similar al observado para glucosa y fructosa. Por su parte, Taniguchi y col. (2004), en un estudio realizado con cepas de *Enterococcus casseliflavus* y *L. casei* cultivadas en MRS suplementado con 50 g/l de xilosa y 100 g/l de glucosa, llegaron a obtener 95 g/l de ácido láctico.

El tipo de isómero del ácido láctico producido en la fermentación de los azúcares es una característica específica de especie para las bacterias lácticas (Connolly y Lönnerdal, 2004). Los ácidos D(-) y L(+)-láctico se forman por la actividad de lactato deshidrogenasas dependientes del NAD y específicas para cada isómero (Mack, 2004) pero además, se ha demostrado que algunos lactobacilos poseen la enzima DL-lactato racemasa, que cataliza la conversión entre ambos isómeros (Hove y Mortensen, 1995). En todas las cepas estudiadas en el presente trabajo, con excepción de *L. gasseri* LM21, el isómero mayoritario fue el ácido L(+)-láctico, independientemente del azúcar suplementado en el medio. En el caso de *L. salivarius* HN6 apenas se detectó producción de D(-)-lactato, mientras que en el resto de las cepas cuyo isómero mayoritario fue el L(+)-lactato, éste representó entre un 85 y un 98% de la producción total. *L. gasseri* LM21 destacó como productor de ácido D(-)-láctico, con un 67-78% del total al cabo de 48 h de incubación, mientras que a las 24 h las concentraciones de ambos isómeros fueron similares. En cambio, la otra cepa de *L. gasseri* estudiada, LC9, aunque produjo una mezcla de ambos isómeros, sintetizó mayoritariamente la isoforma L(+).

Otros autores han observado que *L. salivarius* produce únicamente L(+)-lactato (Hammes y col., 1992; Martín y col., 2006). Asimismo, en distintos trabajos se señala que especies como *L. gasseri*, *L. fermentum* y *L. coryniformis* producen una mezcla racémica (Connolly y Lönnerdal, 2004;

Martín y col., 2005a,b). No obstante, el porcentaje de cada isómero difiere en cada cepa y parece estar también relacionado con el tiempo de incubación. Así, Martín y col. (2005a) obtuvieron aproximadamente un 50% de cada isómero en dos cepas de *L. gasseri* tras 24 h de incubación en MRS, lo que coincide con los resultados observados en el presente trabajo para *L. gasseri* LM21 tras una incubación de 24 h, pero no al final de la misma, tal como se ha mencionado anteriormente. Por su parte, Nout y col. (1989), en un alimento infantil en el que se incluía *L. fermentum*, el contenido de D(-)-lactato representó un 42% del total, de forma similar a lo observado por Martín y col. (2005a). En cambio, la cepa de *L. fermentum* estudiada en el presente trabajo fue eminentemente productora de ácido L(+)-láctico.

Por lo que se refiere al tipo de isómero producido por las cepas de *Enterococcus* sp., la forma mayoritaria fue el ácido L(+)-láctico, con niveles comprendidos entre el 77 y el 99%, lo que coincide con lo observado por Yun y col. (2003).

En relación con las posibles implicaciones toxicológicas del ácido D(-)-láctico en el desarrollo de acidosis, dado que las cepas estudiadas en este trabajo, excepto *L. gasseri* LM21, produjeron mayoritariamente el isómero L(+), su utilización en productos fermentados no supondría ningún problema. Por otra parte, tal y como se ha señalado en la Introducción de esta memoria, existen estudios que cuestionan la toxicidad del isómero D(-); a ello hay que unir que las principales bacterias lácticas asociadas a los productos fermentados producen una mezcla de ácido D(-)- y L(+)-láctico y no se han asociado casos de acidosis a su consumo.

Tabla 9. Producción de los isómeros D(-)-láctico y L(+)-láctico (g/l) por las bacterias seleccionadas en un medio suplementado con glucosa (50 g/l).

Microorganismo	Anaerobiosis					
	24 horas			48 horas		
	D(-)-láctico	L(+)-láctico	Total	D(-)-láctico	L(+)-láctico	Total
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	2,8 <sup>b</sup>	18,9 <sup>a</sup>	21,7 <sup>β</sup>	2,9 <sup>b,c</sup>	36,9 <sup>a</sup>	39,8 <sup>α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	3,7 <sup>b</sup>	18,8 <sup>a</sup>	22,5 <sup>β</sup>	3,1 <sup>b,c</sup>	33,9 <sup>a</sup>	37,0 <sup>α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	12,0 <sup>a</sup>	9,3 <sup>b</sup>	21,3 <sup>β</sup>	27,3 <sup>a</sup>	13,6 <sup>b</sup>	40,9 <sup>α</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	2,5 <sup>b</sup>	22,6 <sup>a</sup>	23,1 <sup>β</sup>	0,6 <sup>e</sup>	37,1 <sup>a</sup>	37,7 <sup>α</sup>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	0,5 <sup>c</sup>	18,6 <sup>a</sup>	22,7 <sup>β</sup>	3,8 <sup>b</sup>	34,3 <sup>a</sup>	38,1 <sup>α</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	3,3 <sup>b</sup>	20,5 <sup>a</sup>	23,8 <sup>β</sup>	1,6 <sup>d</sup>	37,5 <sup>a</sup>	39,1 <sup>α</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	2,1 <sup>b</sup>	19,1 <sup>a</sup>	21,1 <sup>β</sup>	3,2 <sup>b,c</sup>	35,5 <sup>a</sup>	38,7 <sup>α</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	1,7 <sup>b,c</sup>	20,6 <sup>a</sup>	22,3 <sup>β</sup>	2,2 <sup>c,d</sup>	35,5 <sup>a</sup>	37,8 <sup>α</sup>

a,b,c,d,e: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

α,β: medias entre valores de producción total con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

Tabla 10. Producción de los isómeros D(-)-láctico y L(+)-láctico (g/l) por las bacterias seleccionadas en un medio suplementado con fructosa (50 g/l).

Microorganismo	Anaerobiosis					
	24 horas			48 horas		
	D(-)-láctico	L(+)-láctico	Total	D(-)-láctico	L(+)-láctico	Total
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	4,1 <sup>b</sup>	18,8 <sup>b</sup>	22,9 <sup>β</sup>	5,7 <sup>b</sup>	33,3 <sup>b</sup>	39,0 <sup>α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	3,8 <sup>b</sup>	17,8 <sup>b</sup>	21,6 <sup>β</sup>	5,1 <sup>b</sup>	33,2 <sup>b</sup>	38,2 <sup>α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	11,7 <sup>a</sup>	11,5 <sup>c</sup>	23,2 <sup>β</sup>	26,1 <sup>a</sup>	10,8 <sup>c</sup>	36,9 <sup>α</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	0,4 <sup>d</sup>	23,6 <sup>a</sup>	24,0 <sup>β</sup>	0,8 <sup>d</sup>	38,0 <sup>a</sup>	38,8 <sup>α</sup>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	2,8 <sup>c</sup>	18,9 <sup>b</sup>	21,7 <sup>β</sup>	5,4 <sup>b</sup>	33,0 <sup>b</sup>	38,4 <sup>α</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	2,6 <sup>c</sup>	19,9 <sup>b</sup>	22,5 <sup>β</sup>	4,6 <sup>b</sup>	33,8 <sup>b</sup>	39,5 <sup>α</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	4,9 <sup>b</sup>	16,5 <sup>b</sup>	21,4 <sup>β</sup>	4,8 <sup>b</sup>	33,5 <sup>b</sup>	38,3 <sup>α</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	2,8 <sup>c</sup>	18,0 <sup>b</sup>	20,8 <sup>β</sup>	3,1 <sup>c</sup>	33,3 <sup>b</sup>	36,4 <sup>α</sup>

a,b,c: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

α,β: medias entre valores de producción total con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )



Tabla 11. Producción de los isómeros D(-)-láctico y L(+)-láctico (g/l) por las bacterias seleccionadas en un medio suplementado con galactosa (50 g/l).

Microorganismo	Anaerobiosis					
	24 horas			48 horas		
	D(-)-láctico	L(+)-láctico	Total	D(-)-láctico	L(+)-láctico	Total
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	4,2 <sup>b</sup>	18,5 <sup>a</sup>	22,6 <sup>β</sup>	3,7 <sup>b</sup>	34,6 <sup>a</sup>	38,3 <sup>α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	3,0 <sup>b</sup>	18,9 <sup>a</sup>	21,9 <sup>β</sup>	3,4 <sup>b</sup>	34,7 <sup>a</sup>	38,1 <sup>α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	12,2 <sup>a</sup>	9,1 <sup>b</sup>	21,2 <sup>β</sup>	28,8 <sup>a</sup>	8,2 <sup>b</sup>	37,0 <sup>α</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	nd <sup>d</sup>	22,1 <sup>a</sup>	22,1 <sup>β</sup>	0,6 <sup>c</sup>	37,4 <sup>a</sup>	38,0 <sup>α</sup>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	3,4 <sup>b</sup>	19,4 <sup>a</sup>	22,8 <sup>β</sup>	4,1 <sup>b</sup>	34,3 <sup>a</sup>	38,4 <sup>α</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	1,5 <sup>c</sup>	21,2 <sup>a</sup>	22,7 <sup>β</sup>	2,9 <sup>b</sup>	35,0 <sup>a</sup>	37,9 <sup>α</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	2,0 <sup>c</sup>	20,8 <sup>a</sup>	22,8 <sup>β</sup>	3,2 <sup>b</sup>	33,4 <sup>a</sup>	36,6 <sup>α</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	3,6 <sup>b</sup>	19,0 <sup>a</sup>	22,6 <sup>β</sup>	4,6 <sup>b</sup>	35,1 <sup>a</sup>	39,6 <sup>α</sup>

nd: no se detectó producción

a,b,c,d: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

α,β: medias entre valores de producción total con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

Tabla 12. Producción de los isómeros D(-)-láctico y L(+)-láctico (g/l) por las bacterias seleccionadas en un medio suplementado con lactosa (50 g/l).

Microorganismo	Anaerobiosis					
	24 horas			48 horas		
	D(-)-láctico	L(+)-láctico	Total	D(-)-láctico	L(+)-láctico	Total
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	1,9 <sup>c</sup>	16,9 <sup>a,b</sup>	18,8 <sup>a,b,β</sup>	4,7 <sup>b</sup>	33,7 <sup>a</sup>	38,4 <sup>α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	3,5 <sup>b</sup>	16,4 <sup>a,b</sup>	19,9 <sup>a,β</sup>	4,9 <sup>b</sup>	33,8 <sup>a</sup>	38,7 <sup>α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	10,7 <sup>a</sup>	8,7 <sup>c</sup>	19,4 <sup>a,β</sup>	28,5 <sup>a</sup>	8,8 <sup>b</sup>	37,3 <sup>α</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	0,9 <sup>c</sup>	19,5 <sup>a</sup>	20,4 <sup>a,β</sup>	1,0 <sup>d</sup>	37,6 <sup>a</sup>	38,6 <sup>α</sup>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	1,5 <sup>c</sup>	18,8 <sup>a</sup>	20,3 <sup>a,β</sup>	5,4 <sup>b</sup>	33,5 <sup>a</sup>	38,9 <sup>α</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	4,6 <sup>b</sup>	15,3 <sup>b</sup>	19,9 <sup>a,β</sup>	5,8 <sup>b</sup>	33,3 <sup>a</sup>	39,1 <sup>α</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	0,3 <sup>d</sup>	14,7 <sup>b</sup>	15,0 <sup>b,β</sup>	5,9 <sup>b</sup>	33,4 <sup>a</sup>	39,3 <sup>α</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	2,4 <sup>b,c</sup>	15,9 <sup>a,b</sup>	18,4 <sup>a,b,β</sup>	3,1 <sup>c</sup>	35,3 <sup>a</sup>	38,5 <sup>α</sup>

a,b,c,d: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

α,β: medias entre valores de producción total con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

### III.3.2. Producción de ácidos grasos de cadena corta

Todas las cepas estudiadas mostraron la máxima producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) a las 48 h de incubación. Esta producción se muestra en la Figura 9. *E. faecalis* LM24 destacó como la principal productora, llegando a concentraciones superiores a 30 mmol/l cuando se utilizó lactosa como sustrato. Por su parte, *E. faecium* LJx4 y LM27, *L. coryniformis* Q8, *L. salivarius* HN6 y *L. fermentum* LC40 registraron niveles comprendidos entre 10 y 15 mmol/l, mientras que la producción de AGCC por las dos cepas de *L. gasseri* fue notablemente menor.

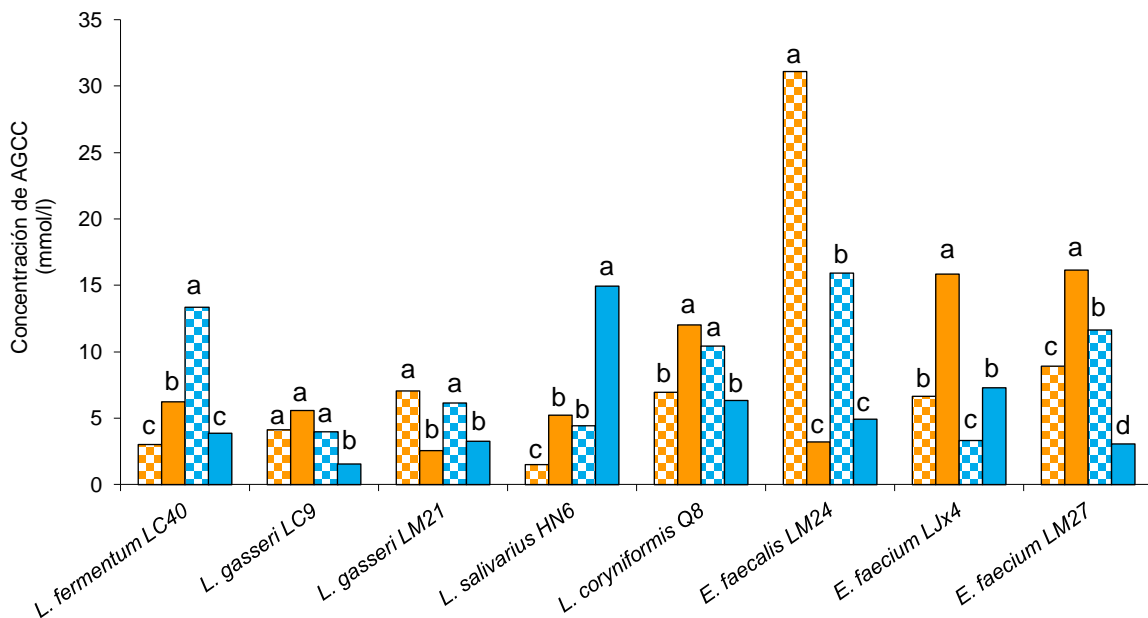


Figura 9. Producción total (48 h) de ácidos grasos de cadena corta (mmol/l) por las bacterias seleccionadas en un medio suplementado con 50 g/l de lactosa (■), fructosa (■), galactosa (■) o glucosa (■). a,b,c,d: columnas con distinta letra para cada cepa difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

A diferencia de la producción de ácido láctico, en este caso sí se observaron diferencias importantes en la producción de AGCC dependiendo del azúcar utilizado. Estas observaciones están de acuerdo con otros autores que señalan que, además de la capacidad intrínseca de los microorganismos, el sustrato utilizado para la fermentación desempeña un papel crucial en la producción de ácidos orgánicos (Sakata y col., 2003; Macfarlane y Macfarlane, 2003). Así, *E. faecalis* LM24, utilizó como principales sustratos galactosa y,

sobre todo, lactosa. Algunos autores (Mäkivuokko y col., 2006) han observado que la incorporación de lactosa al medio de incubación puede aumentar la concentración de AGCC considerablemente, entre 3 y 5 veces. No obstante, las otras dos cepas de enterococos estudiadas presentaron la máxima producción de AGCC cuando se incorporó fructosa al medio de incubación. *L. coryniformis* Q8 utilizó de forma similar tanto fructosa como galactosa. Este carbohidrato fue también el principal sustrato para *L. fermentum* LC40, mientras que para *L. salivarius* HN6 fue la glucosa.

Las Tablas 13-16 muestran los resultados de la producción de los distintos AGCC (acético, propiónico, butírico, valérico, caproico y caprílico) producidos por las cepas seleccionadas con los diferentes sustratos. Los AGCC mayoritarios fueron acético, propiónico y, en menor medida, butírico. Distintos autores señalan que las bacterias presentes en el colon producen acético:propiónico:butírico en una relación molar de 3:1:1 (Cummings y col., 1987; Topping y Clifton, 2001). En las cepas objeto de este trabajo, los enterococos se ajustaron más a este patrón que los lactobacilos. En las Figuras 10 y 11 se muestra la producción de los ácidos acético y propiónico, respectivamente, en todas las cepas tras 48 h de incubación. Los enterococos destacaron por la producción de ácido acético, que cuando se empleó lactosa, en *E. faecalis* LM24 alcanzó una concentración de 28 mmol/l, más de un 86% de la producción total. Por su parte, las dos cepas de *L. gasseri* apenas produjeron ácido acético e incluso en algunas condiciones llegaron a consumirlo. Estas cepas produjeron mayoritariamente ácido propiónico, aunque en baja cantidad, en torno a 3 mmol/l. En el resto de los lactobacilos, de un modo general, la concentración de los ácidos acético y propiónico no superó los 10 mmol/l. Por lo que se refiere al ácido butírico, el principal productor fue *E. faecium* LJx4, con una concentración de 4,4 mmol/l, aproximadamente un 30% del total de AGCC producidos cuando se utilizó fructosa en el medio de incubación.

Según la bibliografía consultada, el género *Lactobacillus* produce fundamentalmente ácido acético y propiónico en la fermentación de los carbohidratos, mientras que no destaca por la producción de ácido butírico (Cummings y Macfarlane, 1991; Macfarlane y Macfarlane, 2003). Los niveles

máximos de ácido acético que se citan en la mayoría de los trabajos no suelen superar los 2 mmol/l (Hove y col., 1994; Commane y col., 2005). En el presente trabajo se han obtenido valores superiores (3-8 mmol/l) para *L. fermentum* LC40, *L. salivarius* HN6 y *L. coryniformis* Q8 en la mayoría de las condiciones de incubación. Estos valores son similares a los observados por Tsukahara y col. (2002), en un estudio con lactobacilos aislados de contenido fecal de cerdo e incubados con ácido glucónico como estimulador de la producción de AGCC.

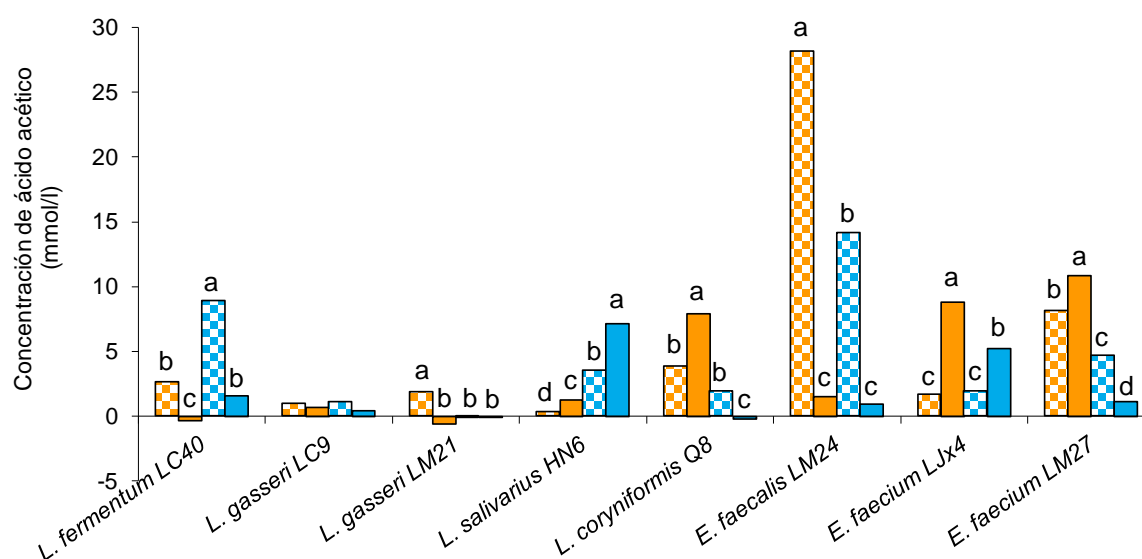


Figura 10. Producción o consumo (48 h) de ácido acético (mmol/l) por las bacterias seleccionadas en un medio suplementado con 50 g/l de lactosa (■), fructosa (■), galactosa (■) o glucosa (■). a,b,c,d: columnas con distinta letra para cada cepa difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

En relación con los enterococos, Yun y col. (2003) sólo observaron producción de ácido acético (119 mmol/l) cuando se utilizó un 30% de galactosa como fuente de carbono, mientras que no se detectó este compuesto en presencia de la misma concentración de glucosa, fructosa o lactosa. Las cantidades de ácido acético producidas por las cepas de enterococos analizadas fueron menores que las mencionadas por Yun y col. (2003), pero en cambio sí se detectó producción de este ácido con todos los sustratos ensayados (Figura 10).

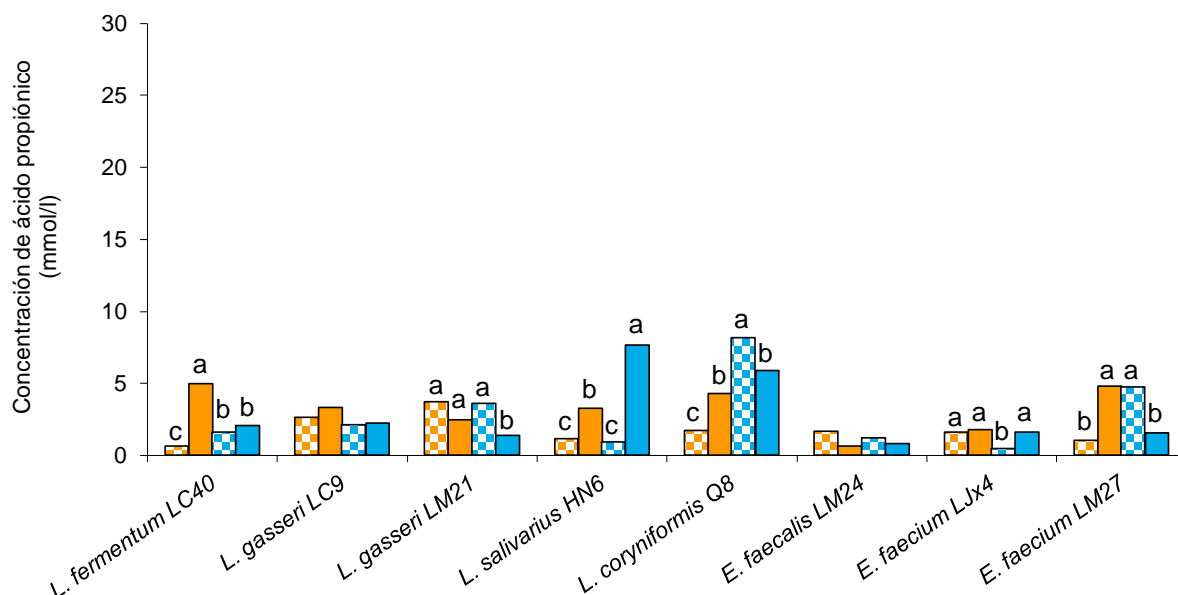


Figura 11. Producción o consumo (48 h) de ácido propiónico (mmol/l) por las bacterias seleccionadas en un medio suplementado con 50 g/l de lactosa (■), fructosa (■), galactosa (■) o glucosa (■). a,b,c: columnas con distinta letra para cada cepa difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

En vista de los resultados obtenidos, parece que las cepas estudiadas utilizaron preferentemente la vía homoláctica para la fermentación de los carbohidratos. En cualquier caso, si se comparan los niveles de AGCC con los datos aportados por otros autores, la producción de ácido acético por algunos lactobacilos superaría la obtenida en otras cepas de este mismo género. Por lo que respecta a los enterococos, si bien la producción fue mayor que en los lactobacilos, ésta se puede considerar moderada en comparación con los datos publicados por otros autores.

Tabla 13. Producción o consumo de ácidos grasos de cadena corta (mmol/l) por las bacterias seleccionadas en un medio suplementado con lactosa (50 g/l) e incubado en anaerobiosis.

Microorganismo	24 horas							48 horas						
	Acet	Prop	But	Vale	Capro	Capri	TOTAL	Acet	Prop	But	Vale	Capro	Capri	TOTAL
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	2,2	0,7	-0,3	-0,4	-0,4	0,1	1,9 <sup>d,β</sup>	2,6	0,6	0,0	0,0	-0,1	-0,1	3,0 <sup>c,α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	0,5	3,5	0,1	-0,3	-0,1	-0,5	3,1 <sup>c</sup>	1,0	2,7	1,4	-0,1	-0,4	-0,3	4,2 <sup>c</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	1,2	1,8	-0,2	-0,1	-0,2	-0,4	2,1 <sup>c,d,β</sup>	1,9	3,7	1,2	0,5	-0,6	0,4	7,1 <sup>b,α</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	0,5	0,8	-0,1	-0,4	-0,2	-0,1	0,5 <sup>e,β</sup>	0,3	1,2	0,6	-0,3	-0,3	0,1	1,6 <sup>d,α</sup>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	1,3	0,1	0,9	-0,2	-0,2	-0,5	1,4 <sup>d,β</sup>	3,8	1,7	0,8	-0,1	-0,1	0,8	7,0 <sup>b,α</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	9,3	0,4	-0,4	0,0	-0,4	0,1	9,0 <sup>a,β</sup>	28,1	1,7	0,1	-0,3	0,9	0,6	31,1 <sup>a,α</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	1,6	0,5	0,2	0,2	-0,5	0,1	2,2 <sup>c,d,β</sup>	1,7	1,6	2,6	0,5	0,5	-0,1	6,7 <sup>b,α</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	3,0	1,2	0,0	0,5	0,4	-0,5	4,7 <sup>b,β</sup>	8,1	1,0	-0,3	0,3	-0,1	-0,2	8,9 <sup>b,α</sup>

Acet: ácido acético; Prop: ácido propiónico; But: ácido butírico; Vale: ácido valérico; Capro: ácido caproico; Capri: ácido caprílico

a,b,c,d: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p < 0,05$ )

α,β: medias entre valores de producción total con distinto superíndice difieren significativamente ( $p < 0,05$ )

Tabla 14. Producción o consumo de ácidos grasos de cadena corta (mmol/l) por las bacterias seleccionadas en un medio suplementado con fructosa (50 g/l) e incubado en anaerobiosis.

Microorganismo	24 horas							48 horas						
	Acet	Prop	But	Vale	Capro	Capri	TOTAL	Acet	Prop	But	Vale	Capro	Capri	TOTAL
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	-0,5	1,7	1,0	0,1	-0,3	-0,5	1,3 <sup>b,c,β</sup>	-0,3	5,0	2,2	0,1	-0,2	-0,5	6,2 <sup>c,α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	-0,5	2,8	0,0	0,3	0,5	-0,4	2,6 <sup>b,β</sup>	0,7	3,4	0,9	0,5	0,6	-0,4	5,6 <sup>c,α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	-0,9	1,1	-0,2	-0,2	-0,5	0,1	-0,6 <sup>d,β</sup>	-0,6	2,5	0,6	0,4	-0,5	0,2	2,6 <sup>d,α</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	-0,5	1,7	-0,2	0,6	-0,1	-0,4	1,2 <sup>c,β</sup>	1,2	3,3	-0,2	1,3	0,1	-0,4	5,3 <sup>c,α</sup>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	3,1	3,4	-0,1	-0,1	-0,6	-0,5	5,3 <sup>a,β</sup>	7,9	4,3	0,2	-0,1	0,0	-0,4	12,0 <sup>b,α</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	1,0	0,2	0,4	0,3	0,6	0,5	2,9 <sup>b</sup>	1,5	0,7	0,1	0,1	0,5	0,4	3,2 <sup>d</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	3,8	1,1	1,2	0,3	-0,3	-0,2	5,9 <sup>a,β</sup>	8,8	1,8	4,4	0,4	0,1	0,4	15,8 <sup>a,α</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	2,6	0,5	-0,2	-0,1	-0,4	-0,5	2,0 <sup>b,c,β</sup>	10,9	4,8	-0,1	0,5	0,1	0,0	16,2 <sup>a,α</sup>

Acet: ácido acético; Prop: ácido propiónico; But: ácido butírico; Vale: ácido valérico; Capro: ácido caproico; Capri: ácido caprílico

a,b,c,d: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

α,β: medias entre valores de producción total con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )



Tabla 15. Producción o consumo de ácidos grasos de cadena corta (mmol/l) por las bacterias seleccionadas en un medio suplementado con galactosa (50 g/l) e incubado en anaerobiosis.

Microorganismo	24 horas							48 horas						
	Acet	Prop	But	Vale	Capro	Capri	TOTAL	Acet	Prop	But	Vale	Capro	Capri	TOTAL
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	2,6	0,6	1,7	-0,3	0,0	-0,2	4,4 <sup>b,β</sup>	8,9	1,6	1,8	0,1	0,8	0,1	13,4 <sup>a,α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	0,3	0,2	0,1	0,0	-0,1	-0,5	0,0 <sup>d,β</sup>	1,1	2,1	0,4	0,4	0,2	-0,2	4,0 <sup>c,d,α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	-0,1	3,3	0,0	-0,2	0,0	-0,1	2,8 <sup>c,β</sup>	-0,1	3,6	2,5	-0,1	0,1	0,1	6,1 <sup>c,α</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	-0,8	0,1	-0,3	-0,3	-0,5	-0,3	-2,0 <sup>d,β</sup>	3,5	0,9	-0,3	-0,1	-0,4	0,7	4,5 <sup>c,d,α</sup>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	1,2	3,4	0,5	-0,2	-0,5	0,1	4,6 <sup>b,β</sup>	1,9	8,1	0,6	-0,2	-0,2	0,2	10,4 <sup>b,α</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	8,5	-0,4	0,1	-0,3	-0,2	-0,4	7,3 <sup>a,β</sup>	14,2	1,2	0,2	-0,2	0,5	0,1	16,0 <sup>a,α</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	0,9	0,8	0,6	-0,3	-0,3	-0,3	1,4 <sup>c,β</sup>	1,9	0,5	1,9	-0,3	-0,3	-0,4	3,3 <sup>d,α</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	2,0	3,1	0,3	0,2	-0,3	-0,2	5,1 <sup>b,β</sup>	4,7	4,8	0,7	0,4	0,8	0,3	11,7 <sup>b,α</sup>

Acet: ácido acético; Prop: ácido propiónico; But: ácido butírico; Vale: ácido valérico; Capro: ácido caproico; Capri: ácido caprílico

a,b,c,d: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

α,β: medias entre valores de producción total con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

Tabla 16. Producción o consumo de ácidos grasos de cadena corta (mmol/l) por las bacterias seleccionadas en un medio suplementado con glucosa (50 g/l) e incubado en anaerobiosis.

Microorganismo	24 horas							48 horas						
	Acet	Prop	But	Vale	Capro	Capri	TOTAL	Acet	Prop	But	Vale	Capro	Capri	TOTAL
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	1,0	0,6	0,0	-0,4	-0,1	-0,1	1,0 <sup>b,β</sup>	1,6	2,1	0,6	-0,2	0,0	-0,2	3,9 <sup>c,α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	0,3	1,3	-0,1	-0,3	-0,5	-0,5	0,2 <sup>c,β</sup>	0,4	2,2	0,1	-0,2	-0,5	-0,5	1,6 <sup>d,α</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	-0,5	0,4	1,3	0,0	-0,6	-0,5	0,1 <sup>c,β</sup>	-0,1	1,4	2,4	0,2	-0,3	-0,3	3,3 <sup>c,α</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	3,1	2,8	0,3	-0,2	-0,5	-0,3	5,2 <sup>a,β</sup>	7,2	7,7	0,4	0,3	-0,3	-0,3	14,9 <sup>a,α</sup>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	-0,6	0,6	0,7	-0,2	-0,4	-0,4	-0,4 <sup>d,β</sup>	-0,2	5,9	1,1	-0,2	-0,1	-0,2	6,4 <sup>b,α</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	0,3	0,4	0,5	0,3	0,1	-0,3	1,2 <sup>b,β</sup>	1,0	0,9	2,8	0,3	0,3	-0,3	4,9 <sup>b,c,α</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	1,1	1,4	-0,3	-0,3	-0,4	-0,5	1,0 <sup>b,β</sup>	5,2	1,6	0,2	0,5	0,1	-0,3	7,3 <sup>b,α</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	-0,4	0,7	-0,4	-0,2	-0,1	0,1	-0,2 <sup>d,β</sup>	1,2	1,6	-0,3	0,6	0,0	0,1	3,1 <sup>c,α</sup>

Acet: ácido acético; Prop: ácido propiónico; But: ácido butírico; Vale: ácido valérico; Capro: ácido caproico; Capri: ácido caprílico

a,b,c,d: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p < 0,05$ )

α,β: medias entre valores de producción total con distinto superíndice difieren significativamente ( $p < 0,05$ )

### III.4. Estudio de la producción de folatos

En la Figura 12 se muestra la producción total (intracelular más extracelular) de folatos (ng/ml) por las cepas estudiadas en distintas condiciones de tensión de oxígeno y tras 24 y 48 h de incubación. En la Tabla 17 se recogen los valores correspondientes a cada cepa. Todas las cepas mostraron una producción neta de folatos en mayor o menor cantidad dependiendo de las condiciones de incubación, siendo *L. coryniformis* Q8 y *E. faecalis* LM24 los microorganismos que alcanzaron los valores mayores, con 2067 y 1949 ng/ml, respectivamente. Las tres cepas de enterococos se caracterizaron por una producción precoz (a las 24 h) y en condiciones de elevada tensión de oxígeno, destacando sobre todo *E. faecalis* LM24, con concentraciones en torno a los 2000 ng/ml. En cambio, en las mismas condiciones de aerobiosis, a las 48 h los niveles de folato disminuyeron, lo que sugiere un consumo de estos compuestos por parte de las cepas. Por lo que se refiere a los niveles de folato total producidos por los enterococos en condiciones de anaerobiosis, los valores nunca alcanzaron los máximos observados cuando la tensión de oxígeno fue elevada y no se apreció una disminución de su concentración a las 48 h de incubación. Los datos en la bibliografía sobre la producción neta o consumo de folatos por los enterococos son variables. Así, Crittenden y col. (2003) señalan a *E. faecium* CSCC 5140 como productor, mientras que Sybesma y col. (2003) observaron que una cepa de *Enterococcus* sp. perteneciente a la colección del NIZO (Holanda) consumía folatos.

Al contrario que los enterococos, la mayor producción de folatos por los lactobacilos tuvo lugar, en general, cuando las cepas se incubaron en anaerobiosis (Figura 12), excepto en el caso de *L. gasseri* LM21, cuyo máximo se dio en condiciones de aerobiosis a las 24 h de incubación. En cualquier caso, los lactobacilos mostraron una mayor variabilidad que los enterococos en función del tiempo de incubación. Algunos autores han observado que los lactobacilos son, en general, consumidores de folatos (Crittenden y col., 2003; Sybesma y col., 2003), con algunas excepciones como los resultados registrados por Sybesma y col. (2003) para una cepa de *L. plantarum*. Por otra parte, Lin y Young (2000) detectaron una máxima producción de folatos en

distintas cepas de *L. acidophilus* y *L. bulgaricus* al cabo 6 h de incubación, tras lo cual observaron una tendencia decreciente. Teniendo en cuenta estos datos, las cepas de lactobacilos estudiadas en el presente trabajo ofrecerían interesantes posibilidades como fuente de folato en productos a los que se incorporaran como probióticos.

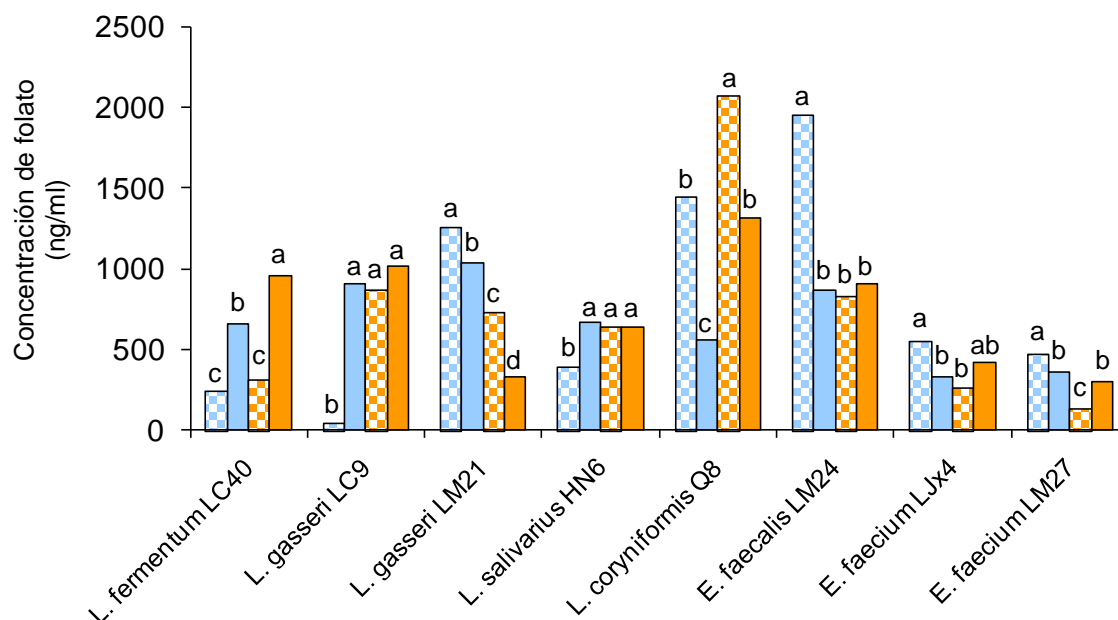


Figura 12. Producción total (ng/ml) de folatos por las bacterias seleccionadas en aerobiosis 24 (▤) y 48 h (▥) y en anaerobiosis 24 (▨) y 48 h (▩). a,b,c,d: columnas con distinta letra para cada cepa difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Los niveles totales de folatos obtenidos en este trabajo son superiores a los que se muestran en la mayoría de los estudios publicados por otros autores. Así, en la bibliografía no se citan concentraciones superiores a 300 ng/ml (Crittenden y col., 2003; Sybesma y col., 2003; Pompei y col., 2007). Esta diferencia se debería en parte al método empleado para la cuantificación de los folatos. La técnica más ampliamente utilizada es un ensayo microbiológico basado en la medida turbidimétrica del crecimiento de una cepa microbiana folato-dependiente (Arcot y Shrestha, 2005). Este método no permite diferenciar el contenido de cada tipo de folato. La caracterización individual sólo se puede hacer mediante técnicas cromatográficas (HPLC), aunque en los trabajos en los que se utiliza este tipo de análisis, el detector empleado (generalmente de fluorescencia) no permite determinar más de 3-4 derivados (Lin y Young, 2000). La combinación de la cromatografía líquida con la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) aumenta la gama de

Tabla 17. Producción de folatos (ng/ml) por las bacterias seleccionadas.

Microorganismos	Aerobiosis						Anaerobiosis					
	24 horas			48 horas			24 horas			48 horas		
	Extra	Intra	TOTAL	Extra	Intra	TOTAL	Extra	Intra	TOTAL	Extra	Intra	TOTAL
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	68 <sup>e</sup>	173 <sup>e</sup>	241 <sup>f</sup>	391 <sup>b</sup>	271 <sup>c</sup>	662 <sup>c</sup>	205 <sup>c</sup>	104 <sup>e</sup>	309 <sup>d</sup>	394 <sup>c</sup>	565 <sup>b</sup>	959 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	10 <sup>f</sup>	30 <sup>f</sup>	40 <sup>g</sup>	51 <sup>e</sup>	851 <sup>a</sup>	901 <sup>a,b</sup>	157 <sup>c</sup>	712 <sup>b</sup>	869 <sup>b</sup>	819 <sup>a</sup>	200 <sup>d,e</sup>	1019 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	675 <sup>a</sup>	576 <sup>c</sup>	1251 <sup>c</sup>	806 <sup>a</sup>	226 <sup>c</sup>	1032 <sup>a</sup>	427 <sup>b</sup>	297 <sup>d</sup>	724 <sup>c</sup>	25 <sup>f</sup>	307 <sup>c,d</sup>	332 <sup>d,e</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	351 <sup>b</sup>	41 <sup>f</sup>	392 <sup>e</sup>	410 <sup>b</sup>	259 <sup>c</sup>	669 <sup>c</sup>	421 <sup>b</sup>	219 <sup>d</sup>	640 <sup>c</sup>	384 <sup>c</sup>	258 <sup>d</sup>	642 <sup>c</sup>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	420 <sup>b</sup>	1022 <sup>b</sup>	1442 <sup>b</sup>	317 <sup>b,c</sup>	241 <sup>c</sup>	558 <sup>c</sup>	1147 <sup>a</sup>	920 <sup>a</sup>	2067 <sup>a</sup>	302 <sup>c,d</sup>	1015 <sup>a</sup>	1317 <sup>a</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	255 <sup>c</sup>	1694 <sup>a</sup>	1949 <sup>a</sup>	256 <sup>c</sup>	607 <sup>b</sup>	863 <sup>b</sup>	327 <sup>b</sup>	500 <sup>c</sup>	827 <sup>b</sup>	515 <sup>b</sup>	390 <sup>c</sup>	905 <sup>b</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	194 <sup>d</sup>	352 <sup>d</sup>	545 <sup>d</sup>	67 <sup>d,e</sup>	260 <sup>c</sup>	327 <sup>d</sup>	127 <sup>c</sup>	137 <sup>e</sup>	264 <sup>d</sup>	218 <sup>d,e</sup>	197 <sup>d,e</sup>	415 <sup>d</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	162 <sup>d</sup>	307 <sup>d</sup>	469 <sup>d,e</sup>	129 <sup>d</sup>	230 <sup>c</sup>	359 <sup>d</sup>	25 <sup>d</sup>	104 <sup>e</sup>	128 <sup>e</sup>	167 <sup>e</sup>	128 <sup>e</sup>	295 <sup>e</sup>

a,b,c,d,e,f,g: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p < 0,05$ )

compuestos que se pueden identificar (Smith y col., 2006; Patring y Jastrebova, 2007). El método analítico empleado en este trabajo, basado en LC-MS/MS permitió la identificación y cuantificación de 8 derivados de los folatos, lo que explicaría en parte los elevados niveles de producción detectados en las cepas estudiadas.

En las Figuras 13 y 14 se muestra la acumulación y excreción de folato por las cepas analizadas en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, respectivamente. Los valores se recogen también en la Tabla 17. Con una elevada tensión de oxígeno, los enterococos mostraron una gran acumulación intracelular de folatos, con valores comprendidos entre el 64 y el 87% del folato total. En general, la relación entre folato intra y extracelular producido por los enterococos se equilibró en condiciones de anaerobiosis.

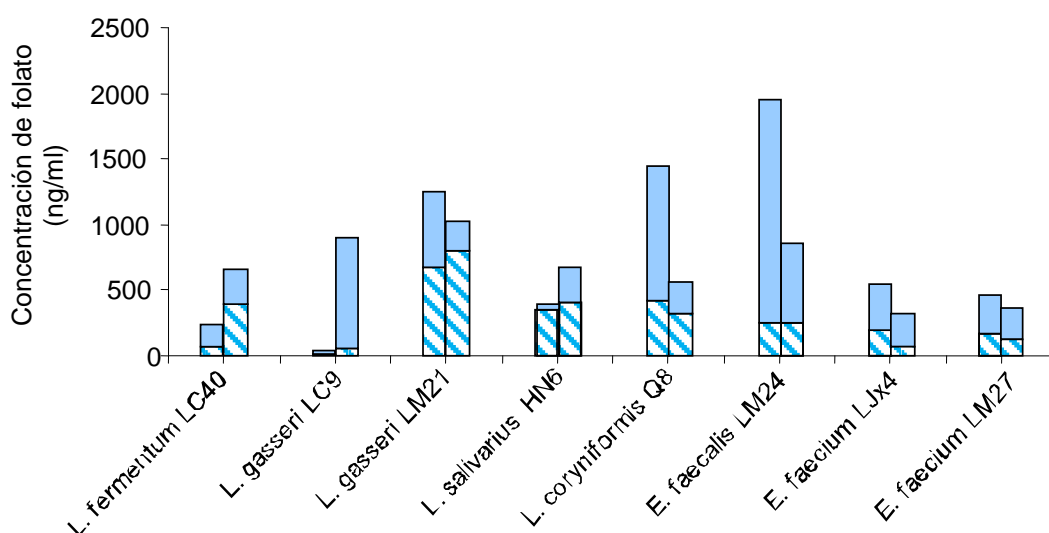


Figura 13. Producción total de folato (ng/ml) a las 24 h (primera columna) y a las 48 h (segunda columna) de incubación en condiciones de aerobiosis. Folato extracelular (■); folato intracelular (▨).

Por lo que se refiere a los lactobacilos, el balance entre excreción y acumulación de folatos fue heterogéneo, aunque hubo cepas como *L. salivarius* HN6 en las que predominó la eliminación de folatos al medio, independientemente de las condiciones y tiempo de incubación. En esta cepa más del 60% del folato total fue extracelular, llegando incluso al 90% cuando se incubó durante 24 h en aerobiosis. *L. gasseri* LM21 también produjo cantidades importantes de folato extracelular en la mayoría de las condiciones ensayadas.

Esta producción extracelular sería interesante desde el punto de vista de la síntesis en el propio intestino. Si bien la mayor parte de la absorción tiene lugar en el yeyuno, se ha demostrado que el folato producido por la microbiota del colon se puede absorber en el intestino grueso (Camilo y col., 1996).

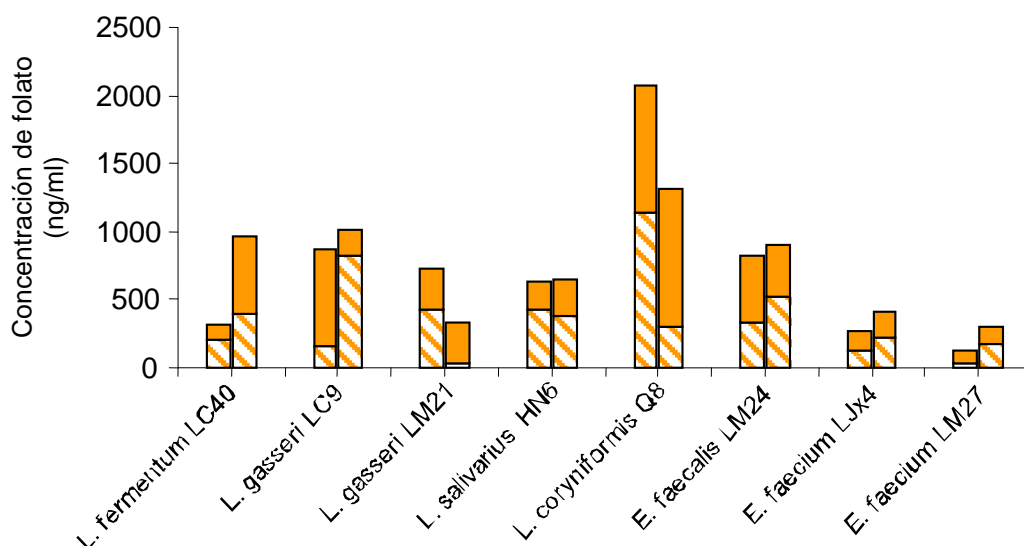


Figura 14. Producción total de folato (ng/ml) a las 24 h (primera columna) y a las 48 h (segunda columna) de incubación en condiciones de anaerobiosis. Folato extracelular (▨); folato intracelular (■).

Las Figuras 15-22 muestran el perfil de folatos obtenido para cada cepa. Para su confección se ha utilizado la suma de los niveles intra y extracelular de cada derivado y se ha considerado el tiempo de incubación en el que se alcanzaron los valores máximos de producción de total (Figura 12). Por lo tanto, para las cepas de enterococos y para *L. gasseri* LM21 y *L. coryniformis* Q8 se muestran los resultados a las 24 h de incubación, mientras que para el resto de lactobacilos se recogen los datos a las 48 h.

Cada tipo de folato participa a distintos niveles en el metabolismo de los ácidos nucleicos. Los tetrahidrofolatos pueden presentar varios grupos de un carbono, como formilo, metenilo, metileno o metilo, que participan activamente en el metabolismo C1. Por ejemplo, el 10-formiltetrahidrofolato (10-formil-THF) es utilizado como donante C1 por varias transferasas y otras enzimas implicadas en la biosíntesis de purinas. El 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-metilen-THF) participa en la síntesis de timidilato a partir de la desoxiuridina monofosfato por la acción de la timidilato sintasa. La metionina sintasa utiliza el 5-metiltetrahidrofolato (5-metil-THF) en la conversión de L-homocisteína a L-

metionina que se transforma en S-adenosilmetionina, donante universal de grupos metilo para los ácidos nucleicos, hormonas, neurotransmisores, lípidos de las membranas, etc. (Stover y Schirch, 1993; Selhub, 2002). Por tanto, teniendo en cuenta la participación de los distintos derivados de los folatos en todas estas rutas, se consideró de interés analizar el perfil de los derivados sintetizados por cada una de las cepas estudiadas en este trabajo.

En la Figura 15 se observa la producción de folatos por *L. fermentum* LC40. Los compuestos que esta cepa sintetizó en mayor cantidad fueron el 10-formil-THF y el 5,10-meteniltetrahidrofolato (5,10-metenil-THF) que alcanzaron, en función de las condiciones de incubación, valores superiores a 250 ng/ml. En general, la producción de folatos fue mayor en anaerobiosis, destacando el incremento experimentado en estas condiciones por el ácido fólico y el 5-formiltetrahidrofolato (5-formil-THF), cuyo contenido aumentó 12 y 8 veces, respectivamente, en comparación con la síntesis en aerobiosis.

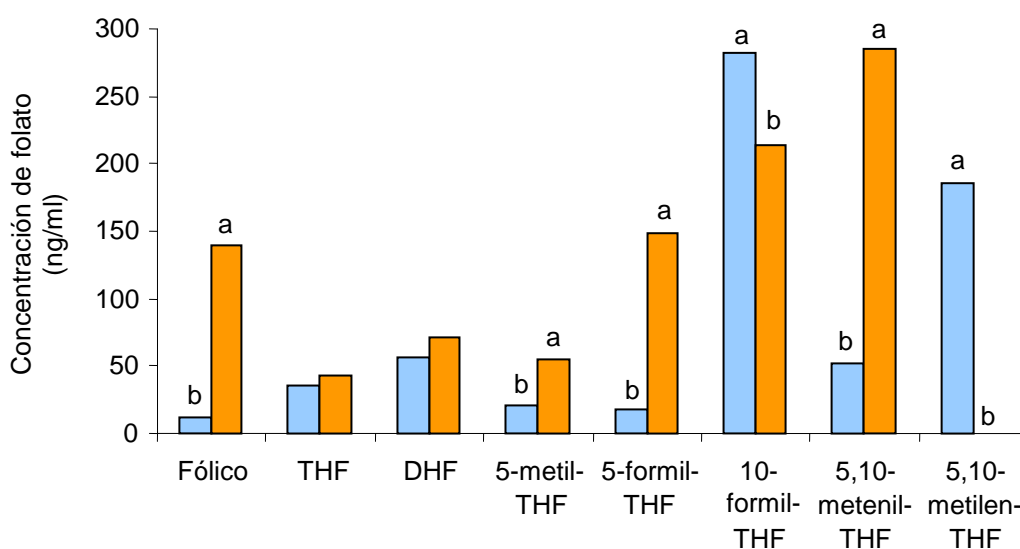


Figura 15. Perfil de folatos sintetizados por *Lactobacillus fermentum* LC40 en aerobiosis (■) y anaerobiosis (■) tras 48 h de incubación. Cada barra refleja la suma de la síntesis intracelular y extracelular. a,b: columnas con distinta letra para cada folato difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

El compuesto que *L. gasseri* LC9 (Figura 16) sintetizó en mayor cantidad fue el 5,10-metenil-THF, alcanzando valores próximos a 300 ng/ml. En relación con la tensión de oxígeno cabe señalar que la producción de dihidrofolato (DHF) se triplicó en condiciones de anaerobiosis, mientras que la síntesis de ácido fólico se redujo a una tercera parte en las mismas condiciones.



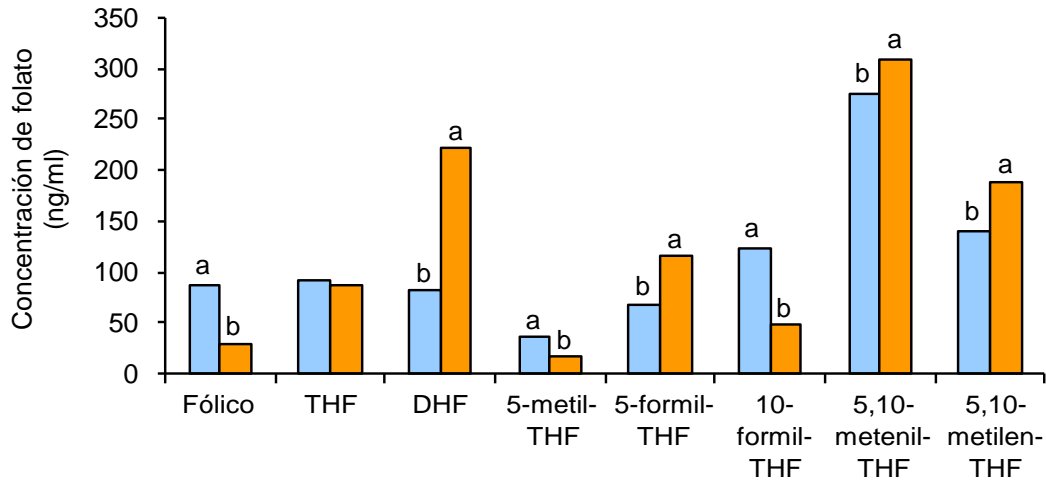


Figura 16. Perfil de folatos sintetizados por *Lactobacillus gasseri* LC9 en aerobiosis (■) y anaerobiosis (■) tras 48 h de incubación. Cada barra refleja la suma de la síntesis intracelular y extracelular. a,b: columnas con distinta letra para cada folato difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

En la Figura 17 se observa la producción de folatos por *L. gasseri* LM21. Esta cepa sintetizó en mayor cantidad 10-formil-THF, 5,10-metenil-THF y 5,10-metilen-THF, alcanzando en este último caso valores próximos a 400 ng/ml. En general, la producción de folatos fue mayor en aerobiosis, destacando en estas condiciones el ácido fólico y el 10-formil-THF, cuyo contenido fue 4 y 25 veces más alto, respectivamente, en comparación con la síntesis en anaerobiosis. Por su parte, la producción de 5,10-metilen-THF aumentó notablemente en condiciones de baja tensión de oxígeno, sextuplicándose en comparación con la síntesis en aerobiosis.

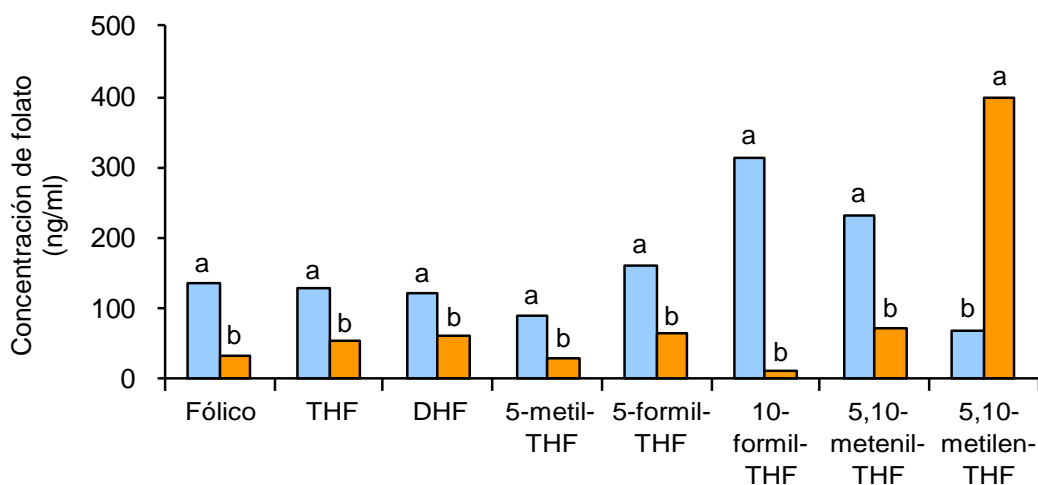


Figura 17. Perfil de folatos sintetizados por *Lactobacillus gasseri* LM21 en aerobiosis (■) y anaerobiosis (■) tras 24 h de incubación. Cada barra refleja la suma de la síntesis intracelular y extracelular. a,b: columnas con distinta letra para cada folato difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Por lo que se refiere a *L. salivarius* HN6 (Figura 18), los más abundantes fueron el 5,10-metenil-THF y 5,10-metilen-THF, con concentraciones en torno a 300 ng/ml, mientras que el resto de folatos no superó los 100 ng/ml. Salvo en el caso del 5,10-metenil-THF, cuyo contenido se multiplicó 32 veces en aerobiosis, no se observaron diferencias para el resto de derivados en función de la tensión de oxígeno del medio.

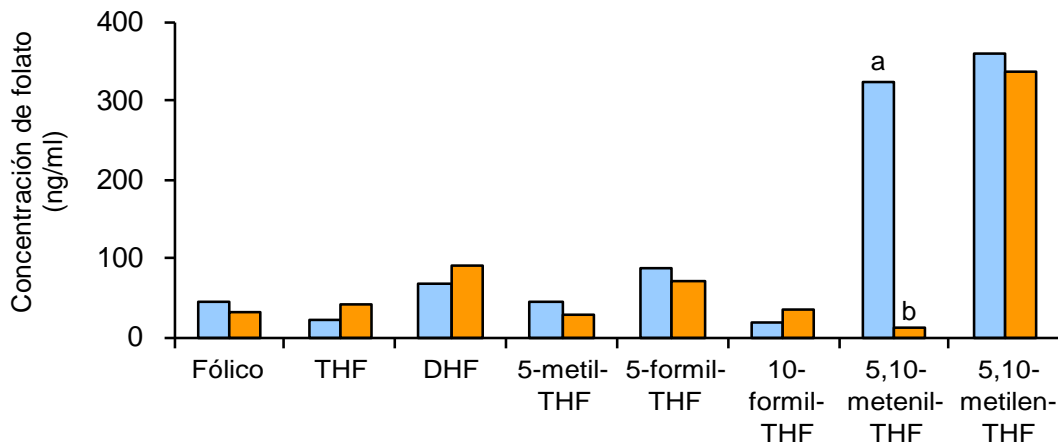


Figura 18. Perfil de folatos sintetizados por *Lactobacillus salivarius* HN6 en aerobiosis (■) y anaerobiosis (■) tras 48 h de incubación. Cada barra refleja la suma de la síntesis intracelular y extracelular. a,b: columnas con distinta letra para cada folato difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

En la Figura 19 se muestran los folatos sintetizados por *L. coryniformis* Q8. DHF, 5-formil-THF, ácido fólico y 5,10-metenil-THF fueron los derivados mayoritarios, con valores comprendidos entre 300 y 500 ng/ml. En general, la producción fue mayor en anaerobiosis, excepto para 5,10-metenil-THF y 5,10-metilen-THF. Cabe destacar el incremento experimentado en anaerobiosis por el ácido fólico, cuyo contenido se multiplicó por cuatro, y el aumento de la concentración de 5,10-metenil-THF, que en presencia de oxígeno fue tres veces mayor que en anaerobiosis.

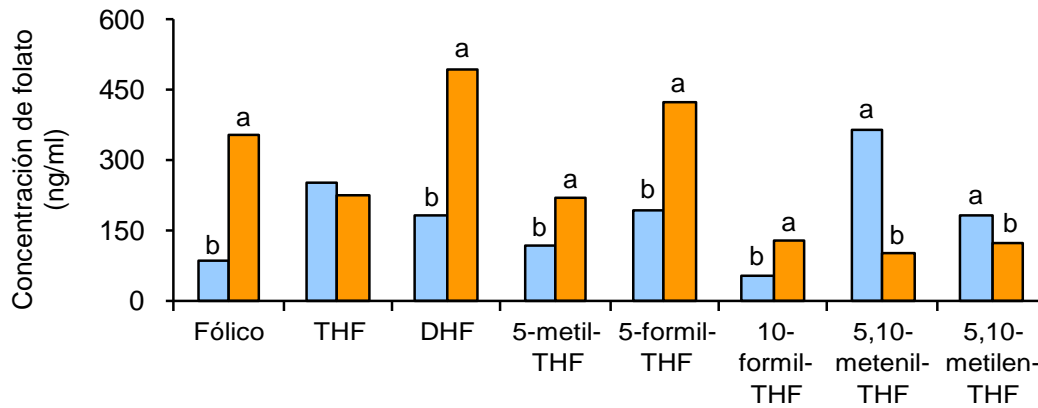


Figura 19. Perfil de folatos sintetizados por *Lactobacillus coryniformis* Q8 en aerobiosis (■) y anaerobiosis (■) tras 24 h de incubación. Cada barra refleja la suma de la síntesis intracelular y extracelular. a,b: columnas con distinta letra para cada folato difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

*E. faecalis* LM24 (Figura 20) destacó por la síntesis de folatos en condiciones de aerobiosis. En estas condiciones los compuestos mayoritarios fueron DHF, con valores próximos a los 600 ng/ml y THF, cuya concentración superó los 300 ng/ml.

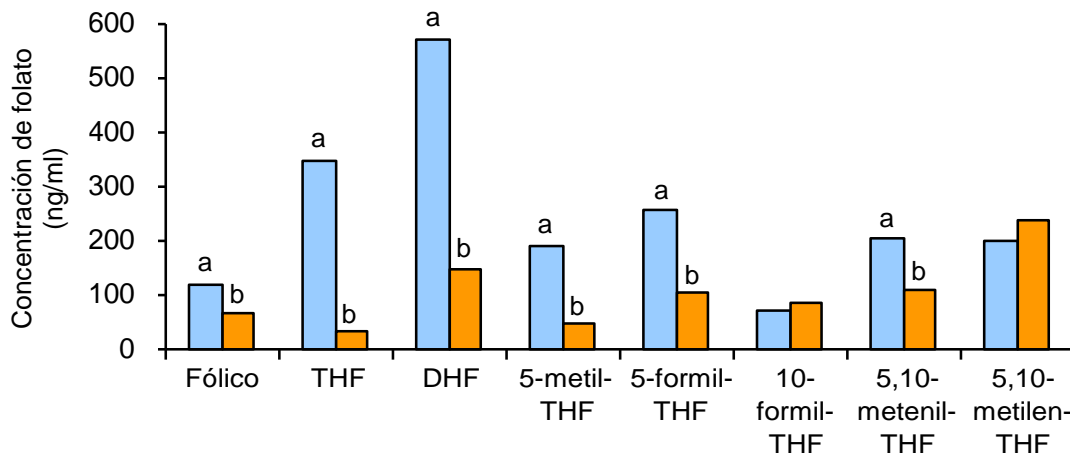


Figura 20. Perfil de folatos sintetizados por *Enterococcus faecalis* LM24 en aerobiosis (■) y anaerobiosis (■) tras 24 h de incubación. Cada barra refleja la suma de la síntesis intracelular y extracelular. a,b: columnas con distinta letra para cada folato difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

A diferencia de *E. faecalis* LM24, la producción de folatos por *E. faecium* LJx4 fue bastante limitada (Figura 21), siendo el 5,10-metilen-THF el compuesto mayoritario, con niveles del orden de 200 ng/ml en aerobiosis. La otra cepa de *E. faecium* analizada, la LM27, mostró un comportamiento similar

(Figura 22), con niveles bajos de folatos, a excepción del 5,10-metenil-THF y también el 5,10-metilen-THF, cuya producción fue igualmente mayoritaria en condiciones de aerobiosis, con valores comprendidos entre 100 y 200 ng/ml.

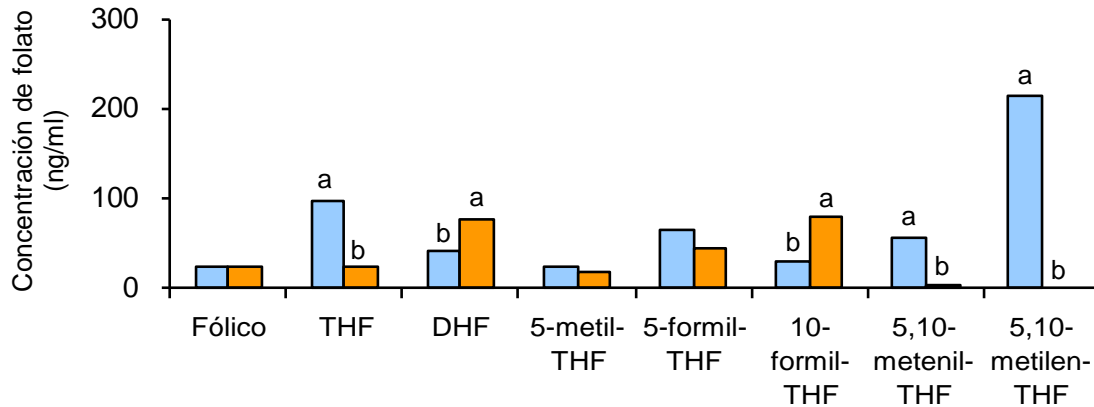


Figura 21. Perfil de folatos sintetizados por *Enterococcus faecium* LJx4 en aerobiosis (■) y anaerobiosis (■) tras 24 h de incubación. Cada barra refleja la suma de la síntesis intracelular y extracelular. a,b: columnas con distinta letra para cada folato difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

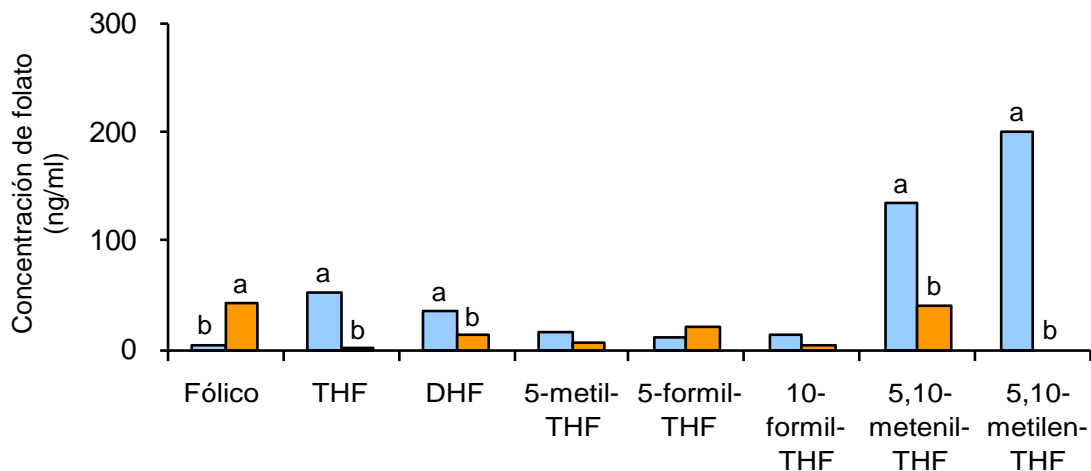


Figura 22. Perfil de folatos sintetizados por *Enterococcus faecium* LM27 en aerobiosis (■) y anaerobiosis (■) tras 24 h de incubación. Cada barra refleja la suma de la síntesis intracelular y extracelular. a,b: columnas con distinta letra para cada folato difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Sybesma y col. (2003) al estudiar los folatos producidos por cepas de los géneros *Lactococcus* y *Streptococcus* también observaron que el tipo de folato sintetizado está relacionado con la especie. Así, *Streptococcus thermophilus* produjo como derivados mayoritarios 5,10-metenil-THF y 5-formil-THF, mientras que las cepas de *Lactococcus lactis* sintetizaron principalmente 5,10-

metenil-THF y 10-formil-THF. La especificidad de cepa en la síntesis de los distintos tipos de folatos ha sido también observada por otros autores. Así, Lin y Young (2000) señalan diferencias entre cepas de *Bifidobacterium longum*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* en cuanto a la producción de THF, 5-metil-THF y 5-formil-THF. Dado el interés que presentan los folatos, conocer la cantidad y el perfil producido por cepas seleccionadas resulta esencial para escoger aquéllas que presentan una producción más favorable desde el punto de vista funcional o para mejorar su producción mediante herramientas de ingeniería genética (Santos y col., 2010; Iver y col., 2010).

En las Figuras 23 a 25 se compara la producción, entre las cepas objeto de estudio, de tres de los derivados más importantes en el metabolismo de los folatos: 5-metil-THF, 10-formil-THF y 5,10-metilen-THF. Como se puede observar, la producción de 5-metil-THF por *L. coryniformis* Q8 y *E. faecalis* LM24 fue del orden de 200 ng/ml, aunque las condiciones de cultivo fueron diferentes. Las dos cepas de *E. faecium* mostraron una síntesis discreta de este derivado. Lin y Young (2000) señalan para este compuesto una producción comprendida entre 10 y 34 ng/ml en distintas especies de lactobacilos inoculadas en leche tras un período de incubación de 6 h a 37 °C.

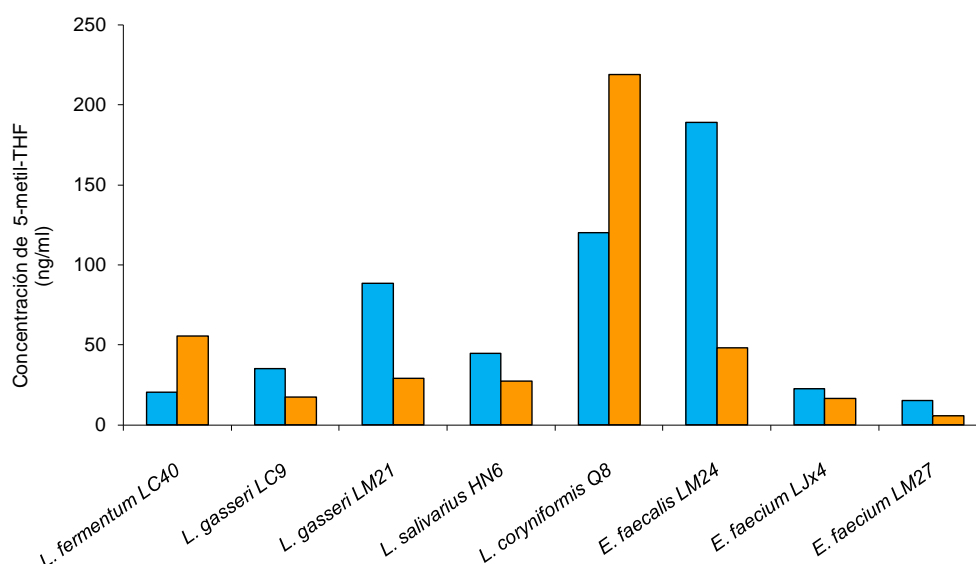


Figura 23. Producción de 5-metil-THF por las bacterias seleccionadas en aerobiosis (■) y anaerobiosis (■) en el tiempo óptimo de incubación. a,b: columnas con distinta letra para cada cepa difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

La producción de 10-formil-THF fue más abundante en las cepas de

lactobacilos, en particular *L. fermentum* LC40 y *L. gasseri* LM21, que alcanzaron concentraciones en torno a 300 ng/ml en condiciones de aerobiosis.

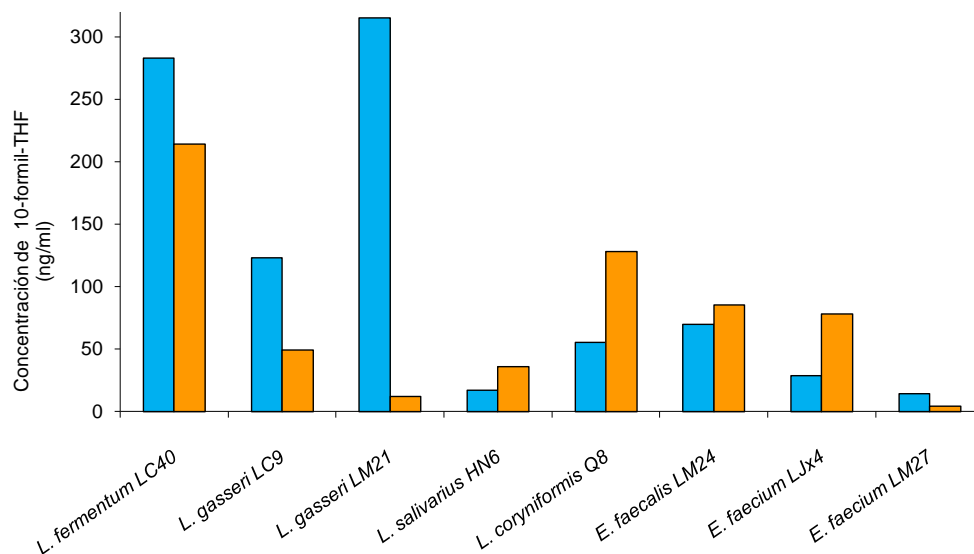


Figura 24. Producción de 10-formil-THF por las bacterias seleccionadas en aerobiosis (■) y anaerobiosis (■) en el tiempo óptimo de incubación. a,b: columnas con distinta letra para cada cepa difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Todas las cepas analizadas alcanzaron como mínimo una producción de 200 ng/ml de 5,10-metilen-THF. Los valores mayores correspondieron a *L. gasseri* LM21 con 400 ng/ml en anaerobiosis y *L. salivarius* HN6 con concentraciones del orden de 350 ng/ml en ambas condiciones de cultivo.

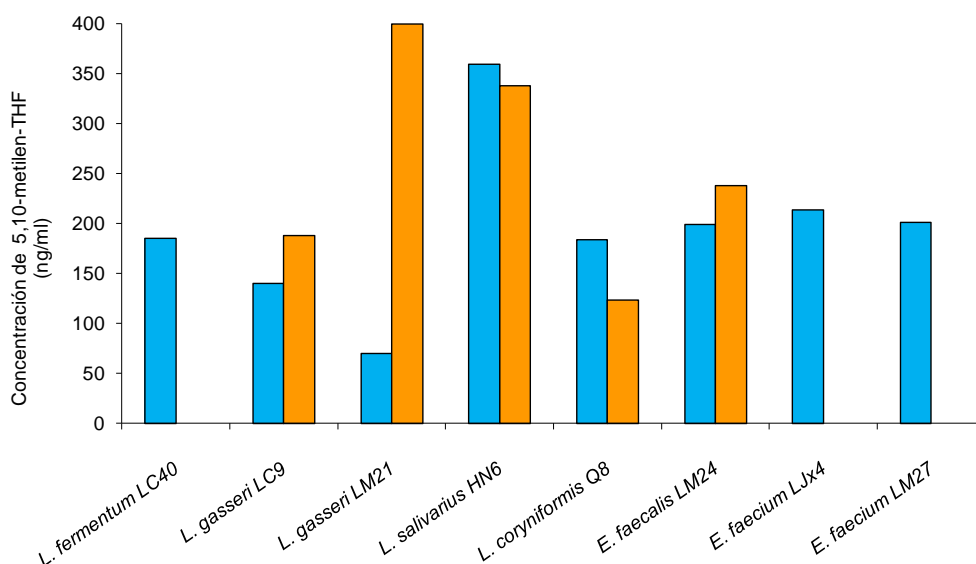


Figura 25. Producción de 5,10-metilen-THF por las bacterias seleccionadas en aerobiosis (■) y anaerobiosis (■) en el tiempo óptimo de incubación. a,b: columnas con distinta letra para cada cepa difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

### III.5. Estudio de la producción de galactooligosacáridos y fructooligosacáridos

Para evaluar la capacidad de producción de estos compuestos por las cepas se determinó en primer lugar su actividad  $\beta$ -galactosidasa y fructosiltransferasa, tras lo cual se procedió a la incubación de los microorganismos en presencia de distintos azúcares y a la posterior extracción y análisis cromatográfico de los oligosacáridos producidos.

#### III.5.1. Evaluación de la actividad $\beta$ -galactosidasa

Como se ha mencionado en la introducción de esta memoria, entre los distintos orígenes que pueden tener los galactooligosacáridos (GOS) se encuentra la actividad de las  $\beta$ -galactosidasas, enzimas que se utilizan ampliamente a escala comercial para la síntesis de estos compuestos (Mahoney, 2003; Rodrigues y col., 2005). Por ello, la detección de la actividad  $\beta$ -galactosidasa puede ser un buen indicador de la potencial capacidad de síntesis microbiana de GOS.

En la Tabla 18 se muestra la actividad  $\beta$ -galactosidasa total (suma de las actividades intracelular, extracelular y de la pared) de las cepas. Dicha actividad osciló entre 1,9 y 2,9 unidades y no se observaron grandes diferencias entre las cepas, ni tampoco como consecuencia de las condiciones de incubación. En contraste con los datos recogidos en la bibliografía (Sasaki y col., 1993; Honda y col. 2007), en el presente trabajo se detectó actividad  $\beta$ -galactosidasa en las dos cepas de *L. gasseri*. Por su parte, Kongo y col. (2007), en un estudio genético y fenotípico de cepas de los géneros *Lactobacillus* spp. y *Enterococcus* spp. aisladas de queso, observaron que los enterococos exhibieron una mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa, hecho que no se apreció en el presente estudio.

Tanto en aerobiosis como en anaerobiosis la actividad  $\beta$ -galactosidasa fue predominantemente intracelular. Estos resultados son lógicos, dado que en la bibliografía se describe como una enzima fundamentalmente intracelular (Montanari y col., 2000). Los valores de actividad intracelular obtenidos en estos estudios son similares a los descritos por Nguyen y col. (2006) en distintas cepas de lactobacilos que se comercializan como iniciadores para la

elaboración de productos lácteos, y superiores a los obtenidos por Montanari y col. (2000) en cepas de *L. brevis* y *L. plantarum*.

Pese a su localización intracelular, también se describe en la bibliografía que los lactobacilos pueden liberar pequeñas cantidades de  $\beta$ -galactosidasa al medio extracelular (Montanari y col., 2000; Akolkar y col., 2006), lo que se produciría por autólisis. En este trabajo se obtuvieron valores de actividad extracelular y de pared de hasta 0,8 unidades/ml, dependiendo de la cepa y de las condiciones de cultivo. La actividad extracelular no se detecta en todos los lactobacilos y así por ejemplo, Montanari y col. (2000) no la observaron en un estudio con 16 cepas de *L. plantarum*, mientras que sí la detectaron en 32 cepas de *L. brevis*, con valores similares a los recogidos en el presente trabajo.



Tabla 18. Actividad  $\beta$ -galactosidasa\* detectada en las cepas estudiadas.

Microorganismo	Aerobiosis				Anaerobiosis			
	Extra	Intra	Pared	TOTAL	Extra	Intra	Pared	TOTAL
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	0,4 <sup><math>\beta</math></sup>	1,1 <sup><math>\alpha</math></sup>	0,6 <sup><math>\beta</math></sup>	2,1	0,3 <sup>b,<math>\beta</math></sup>	1,4 <sup>a,b,<math>\alpha</math></sup>	0,5 <sup><math>\beta</math></sup>	2,0 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	0,3 <sup><math>\beta</math></sup>	1,3 <sup><math>\alpha</math></sup>	0,4 <sup><math>\beta</math></sup>	2,0	0,4 <sup>a,b,<math>\beta</math></sup>	1,0 <sup>b,<math>\alpha</math></sup>	0,6 <sup><math>\beta</math></sup>	1,9 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	0,1 <sup><math>\gamma</math></sup>	1,2 <sup><math>\alpha</math></sup>	0,7 <sup><math>\beta</math></sup>	2,0 <sup>B</sup>	0,4 <sup>a,b,<math>\beta</math></sup>	1,5 <sup>a,<math>\alpha</math></sup>	0,5 <sup><math>\beta</math></sup>	2,4 <sup>a,A</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	0,3 <sup><math>\beta</math></sup>	1,2 <sup><math>\alpha</math></sup>	0,7 <sup><math>\beta</math></sup>	2,1 <sup>B</sup>	0,7 <sup>a,<math>\beta</math></sup>	1,5 <sup>a,<math>\alpha</math></sup>	0,7 <sup><math>\beta</math></sup>	2,9 <sup>a,A</sup>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	0,1 <sup><math>\gamma</math></sup>	1,2 <sup><math>\alpha</math></sup>	0,6 <sup><math>\beta</math></sup>	1,9	0,3 <sup>b,<math>\beta</math></sup>	1,3 <sup>b,<math>\alpha</math></sup>	0,5 <sup><math>\beta</math></sup>	2,0 <sup>b</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	0,3 <sup><math>\beta</math></sup>	1,3 <sup><math>\alpha</math></sup>	0,4 <sup><math>\beta</math></sup>	2,0 <sup>B</sup>	0,3 <sup>b,<math>\beta</math></sup>	1,4 <sup>a,b,<math>\alpha</math></sup>	0,7 <sup><math>\beta</math></sup>	2,4 <sup>a,A</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	0,3 <sup><math>\beta</math></sup>	1,3 <sup><math>\alpha</math></sup>	0,4 <sup><math>\beta</math></sup>	2,0 <sup>B</sup>	0,4 <sup>a,b,<math>\beta</math></sup>	1,6 <sup>a,<math>\alpha</math></sup>	0,5 <sup><math>\beta</math></sup>	2,5 <sup>a,A</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	0,4 <sup><math>\beta</math></sup>	1,3 <sup><math>\alpha</math></sup>	0,4 <sup><math>\beta</math></sup>	2,0	0,2 <sup>b,<math>\beta</math></sup>	1,2 <sup>a,b,<math>\alpha</math></sup>	0,5 <sup><math>\beta</math></sup>	1,9 <sup>b</sup>

\*La unidad de actividad enzimática se estableció como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol/min de orto-nitrofenol en las condiciones de análisis

Extra: actividad  $\beta$ -galactosidasa extracelular; Intra: actividad  $\beta$ -galactosidasa intracelular

a,b: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p < 0,05$ )

$\alpha, \beta, \gamma$ : medias entre columnas con distinto superíndice para la misma condición de cultivo difieren significativamente ( $p < 0,05$ )

A,B: medias entre valores de producción total con distinto superíndice difieren significativamente ( $p < 0,05$ )

### III.5.2. Producción de galactooligosacáridos

Puesto que las diferencias en cuanto a actividad  $\beta$ -galactosidasa no fueron muy importantes entre las distintas cepas, el estudio de la producción de GOS se llevó a cabo en las cuatro que presentaron la mayor actividad total, es decir, *L. salivarius* HN6, *E. faecium* LJx4, *L. gasseri* LM21 y *E. faecalis* LM24, y en condiciones de anaerobiosis.

Todas las cepas estudiadas presentaron una producción neta de GOS, siendo *L. salivarius* HN6 la que produjo mayor cantidad, con valores de 14,2 g/l tras 24 h de incubación (Figura 26). Cabe recordar que *L. salivarius* HN6 fue la cepa que presentó mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa. La producción de GOS se estudió a pH 6,5 y con un 20% de lactosa en el medio, condiciones que favorecen la actividad galactosiltransferasa (Cruz y col., 1999; Splechtna y col., 2006). También es importante tener en cuenta el periodo de incubación, ya que los GOS no son los productos finales de la reacción sino que, una vez alcanzado un máximo en el medio, son sustrato de la hidrólisis por la propia enzima cuando desciende la concentración de lactosa. En cualquier caso, la determinación de la producción de GOS en un medio de cultivo es una fase preliminar en la caracterización de esta actividad microbiana y será necesario purificar las enzimas para poder determinar con más precisión el potencial de síntesis de GOS por las cepas estudiadas.

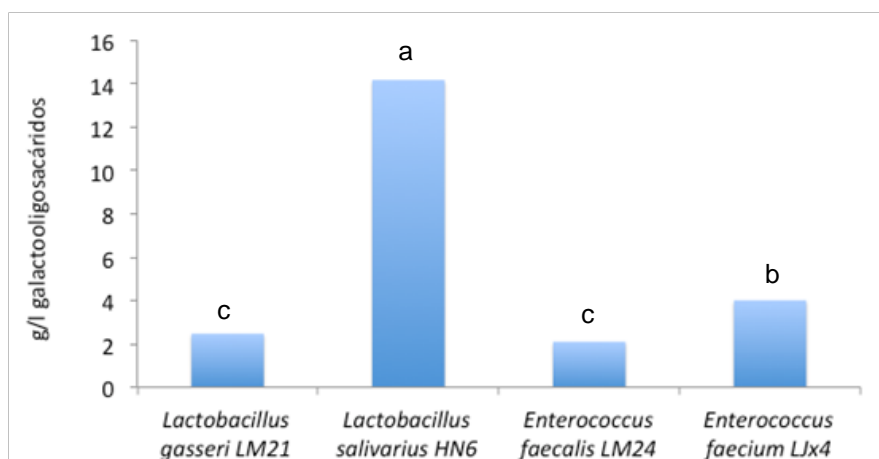


Figura 26. Producción total de galactooligosacáridos (GOS) por las bacterias seleccionadas (g/l). a,b,c: columnas con distinta letra difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

### III.5.3. Evaluación de la actividad fructosiltransferasa

En la Tabla 19 se puede observar la actividad fructosiltransferasa de las diferentes cepas estudiadas. Todas ellas presentaron actividad intracelular, extracelular y ligada a la pared celular. Pese a que en la bibliografía se señala que las fructosiltransferasas están por lo general ligadas a la pared celular o se excretan al medio extracelular (Tieking y Gänzle, 2005), la actividad intracelular de las cepas objeto de estudio fue significativa, con valores similares o superiores a los obtenidos en otras localizaciones.

Por lo general, los microorganismos mostraron mayor actividad en condiciones de anaerobiosis, que en el caso de *L. fermentum* LC40 y *L. gasseri* LM21, llegó a ser un 40% superior respecto a los resultados obtenidos en aerobiosis. Las cepas que presentaron mayor actividad fructosiltransferasa fueron *L. salivarius* HN6, *L. gasseri* LM21, *E. faecium* LJx4 y *E. faecalis* LM24.

Existen numerosos estudios sobre la producción de fructosiltransferasas microbianas, aunque hasta la fecha sólo unos pocos microorganismos tienen potencial interés para su aplicación industrial. La mayoría de ellos son mohos, sobre todo pertenecientes al género *Aspergillus* (Maiorano y col., 2008), aunque en los últimos años también se han caracterizado fructosiltransferasas en algunas bacterias lácticas, como *Lactobacillus reuteri* (Van Hijum y col., 2002, 2004; Schwab y Gänzle, 2006), *Lactobacillus sanfranciscensis* (Tieking y col., 2005a), *Leuconostoc mesenteroides* (Kang y col., 2005; Morales-Arrieta y col., 2006), *Leuconostoc citreum* (Olivares-Illana y col., 2002), *Streptococcus salivarius* (Song y Jacques, 1999) y *Streptococcus mutans* (Schroeder y col., 1989). Parece ser que la expresión de estas enzimas podría producirse como una respuesta al estrés causado por condiciones ambientales adversas (Schwab y col., 2006). No obstante, según se recoge en la bibliografía, la actividad fructosiltransferasa no es frecuente en las bacterias y, en cualquier caso, es menor que en los mohos (Sangeetha y col., 2005).

Tabla 19. Actividad fructosiltransferasa\* observada en las cepas bacterianas estudiadas.

Microorganismo	Aerobiosis				Anaerobiosis			
	Extra	Intra	Pared	TOTAL	Extra	Intra	Pared	TOTAL
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	2,8 <sup>b,β</sup>	4,6 <sup>a,α</sup>	2,4 <sup>c,β</sup>	9,8 <sup>b,B</sup>	3,9 <sup>c,β</sup>	5,0 <sup>b,β</sup>	7,1 <sup>a,α</sup>	16,0 <sup>b,A</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	2,5 <sup>b,β</sup>	2,3 <sup>b,β</sup>	6,1 <sup>a,α</sup>	11,0 <sup>b</sup>	3,3 <sup>c</sup>	4,5 <sup>b</sup>	3,6 <sup>b</sup>	11,4 <sup>c</sup>
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	2,5 <sup>b,β</sup>	5,8 <sup>a,α</sup>	3,3 <sup>c,b,β</sup>	11,6 <sup>a,b,B</sup>	5,4 <sup>b,β</sup>	7,9 <sup>a,α</sup>	5,6 <sup>a,b,β</sup>	18,8 <sup>a,A</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	4,6 <sup>a</sup>	5,7 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	15,2 <sup>a,B</sup>	5,7 <sup>b,β</sup>	8,5 <sup>a,α</sup>	5,9 <sup>a,b,β</sup>	20,0 <sup>a,A</sup>
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	2,8 <sup>b,γ</sup>	6,5 <sup>a,α</sup>	4,9 <sup>a,β</sup>	14,2 <sup>a</sup>	2,6 <sup>c,β</sup>	6,8 <sup>a,b,α</sup>	5,6 <sup>a,b,α</sup>	15,0 <sup>b</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	2,7 <sup>b,β</sup>	5,5 <sup>a,α</sup>	4,6 <sup>a,b,α</sup>	12,8 <sup>a,b,B</sup>	6,5 <sup>a,b,α</sup>	5,6 <sup>b,α,β</sup>	4,6 <sup>b,β</sup>	16,7 <sup>a,A</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	3,5 <sup>a,b,β</sup>	6,6 <sup>a,α</sup>	3,2 <sup>b,c,β</sup>	13,3 <sup>a,b,B</sup>	8,5 <sup>a,α</sup>	4,8 <sup>b,γ</sup>	6,1 <sup>a,β</sup>	19,5 <sup>a,A</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	3,4 <sup>a,b,β</sup>	5,2 <sup>a,α</sup>	3,5 <sup>b,c,β</sup>	12,2 <sup>a,b</sup>	2,5 <sup>c,γ</sup>	4,9 <sup>b,β</sup>	6,5 <sup>a,α</sup>	14,0 <sup>b,c</sup>

\*La unidad de actividad fructosiltransferasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento de 0,1 unidades de absorbancia a 432 nm

Extra: actividad fructosiltransferasa extracelular; Intra: actividad fructosiltransferasa intracelular

a,b,c: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

α,β,γ: medias entre columnas con distinto superíndice para la misma condición de cultivo difieren significativamente ( $p<0,05$ )

A,B: medias entre valores de producción total con distinto superíndice difieren significativamente ( $p<0,05$ )

### III.5.4. Producción de fructooligosacáridos

Aunque no son muchos los trabajos sobre la caracterización de los distintos FOS producidos por las bacterias, sí que existen algunos estudios al respecto. Así por ejemplo, frente a microorganismos como *Bacillus subtilis* que sintetizan sobre todo fructanos de elevado peso molecular (Hernández y col., 1995), las fructosiltransferasas de *L. sanfranciscensis* sintetizan a partir de la sacarosa fundamentalmente FOS de cadena corta (Korakli y col., 2003; Tieking y col., 2005b), al igual que *L. reuteri* (Van Hijum y col., 2002). En cualquier caso, la 1-kestosa, la nistosa y la 1- $\beta$ -fructofuranosil nistosa, constituidas por 1-3 unidades de fructosa, se consideran los principales productos de la actividad de muchas fructosiltransferasas sobre la sacarosa, independientemente del origen de la enzima (Kim y col., 1998). Teniendo en cuenta estos antecedentes se decidió determinar la producción de estos tres compuestos en las cepas que mayor actividad fructosiltransferasa presentaron: *L. salivarius* HN6, *L. gasseri* LM21, *E. faecium* LJx4 y *E. faecalis* LM24.

En estas experiencias apenas se observó síntesis de estos compuestos por las cepas objeto de estudio, siendo *L. gasseri* LM21 la única en la que se detectaron mínimas cantidades de 1-kestosa y nistosa, en torno a 0,2 g/l de cada uno de estos compuestos (Tabla 20). Estos valores son muy bajos si se comparan con los 10 g/l que se han observado en *L. reuteri* (Van Hijum y col., 2002).

Tabla 20. Producción de galactooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS) por las bacterias seleccionadas (g/l).

Microorganismo	GOS	FOS*
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	2,5 <sup>c</sup>	0,38 <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	14,2 <sup>a</sup>	nd <sup>b</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	2,1 <sup>c</sup>	nd <sup>b</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	4,0 <sup>b</sup>	nd <sup>b</sup>

\*suma de 1-kestosa y nistosa

nd: no detectado

a,b,c: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p < 0,05$ )

Como conclusión de este apartado cabe decir que la producción de oligosacáridos en general, y la de FOS en particular, a cargo de las bacterias lácticas no es muy probable que sustituya a los procesos industriales que se utilizan en la actualidad para la producción de prebióticos (Gänzle y col., 2009). No obstante, la utilización de enzimas de bacterias lácticas capaces de producir estos compuestos, aunque sea en pequeña cantidad, podría permitir sintetizar los oligosacáridos más adecuados para el crecimiento de la microbiota intestinal (Tzortzis y col., 2005; Splechtna y col., 2007). También se podría plantear el empleo de extractos crudos de bacterias lácticas para la producción *in situ* de estos compuestos en los alimentos sin necesidad de purificar las enzimas o los oligosacáridos (Vasiljevic y Jelen, 2003), o la sobreexpresión de estas enzimas en otros microorganismos (Corral, 2005).

### III.6. Producción global de compuestos bioactivos

En la Tabla 21 se muestra la producción de los compuestos de interés analizados en las cepas objeto de estudio. Los resultados corresponden a la síntesis en anaerobiosis ya que, aunque algunas cepas mejoraron la producción de algunos de estos compuestos en aerobiosis, en la mayoría de los casos las mayores concentraciones se obtuvieron en condiciones de baja tensión de oxígeno.

Como se puede observar en la Tabla 21, *L. salivarius* HN6 fue el mayor productor de CLA y GOS, aunque los niveles de poliaminas fueron bajos. No obstante, esta cepa también sintetizó concentraciones interesantes de AGCC y folatos. Aunque los niveles de CLA y GOS producidos por *E. faecalis* LM24 no fueron muy elevados, también es destacar en esta cepa la síntesis de poliaminas y AGCC, junto con una producción también razonable de folatos. Por ello, entre todas las cepas estudiadas, *L. salivarius* HN6 y *E. faecalis* LM24 podrían considerarse las más prometedoras para su posible utilización en alimentos funcionales como productoras de compuestos bioactivos. No obstante, será necesario realizar estudios complementarios, principalmente en leche, para definir su aptitud tecnológica.

Por otra parte, también hay que señalar que algunas cepas destacaron por la producción específica de un determinado compuesto, como es el caso de *L. gasseri* LM21, que fue el mayor productor de CLA (tras 48 h de incubación) y de *L. coryniformis* Q8, que sintetizó las concentraciones más elevadas de folatos. Estas cepas también se podrían someter a análisis complementarios con el fin de determinar su utilidad para la producción de estos compuestos, tanto en alimentos como en el propio intestino.

Tabla 22. Producción global de compuestos bioactivos por las bacterias seleccionadas en anaerobiosis.

Microorganismo	Poliaminas (nmol/ml)	CLA (µg/ml)		AGCC <sup>1</sup> (mmol/l)	Folatos (ng/ml)		GOS (g/l)	FOS (g/l)
		24h	48h		24h	48h		
<i>Lactobacillus fermentum</i> LC40	11,1 <sup>c</sup>	24,5 <sup>b</sup>	16,8 <sup>b</sup>	13,4 <sup>b,c</sup>	309 <sup>d</sup>	959 <sup>b</sup>	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i> LC9	14,8 <sup>c</sup>	22,0 <sup>b</sup>	6,1 <sup>c</sup>	5,6 <sup>d</sup>	869 <sup>b</sup>	1019 <sup>b</sup>	-	-
<i>Lactobacillus gasseri</i> LM21	18,7 <sup>b</sup>	-0,8 <sup>d</sup>	<b>64,0<sup>a</sup></b>	7,1 <sup>d</sup>	724 <sup>c</sup>	332 <sup>d,e</sup>	2,5 <sup>c</sup>	0,40
<i>Lactobacillus salivarius</i> HN6	6,7 <sup>d</sup>	<b>41,2<sup>a</sup></b>	22,2 <sup>b</sup>	14,9 <sup>b</sup>	640 <sup>c</sup>	642 <sup>c</sup>	<b>14,2<sup>a</sup></b>	nd
<i>Lactobacillus coryniformis</i> Q8	5,7 <sup>d,e</sup>	6,8 <sup>c</sup>	-5,3 <sup>e</sup>	12,0 <sup>c</sup>	<b>2067<sup>a</sup></b>	<b>1317<sup>a</sup></b>	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> LM24	<b>25,9<sup>a</sup></b>	7,6 <sup>c</sup>	7,1 <sup>c</sup>	<b>31,1<sup>a</sup></b>	827 <sup>b</sup>	905 <sup>b</sup>	2,1 <sup>c</sup>	nd
<i>Enterococcus faecium</i> LJx4	6,9 <sup>d</sup>	4,3 <sup>c</sup>	3,5 <sup>d</sup>	15,8 <sup>b</sup>	264 <sup>d</sup>	415 <sup>d</sup>	4,0 <sup>b</sup>	nd
<i>Enterococcus faecium</i> LM27	12,3 <sup>c</sup>	28,4 <sup>b</sup>	20,2 <sup>b</sup>	16,2 <sup>b</sup>	128 <sup>e</sup>	295 <sup>e</sup>	-	-

<sup>1</sup> Se muestra el dato correspondiente al azúcar que rindió la mayor producción de AGCC

nd: no se detectó producción

(-) no se analizó la producción

a,b,c,d,e: medias en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ( $p < 0,05$ )





**CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**



1. La síntesis de poliaminas se vio afectada por la tensión de oxígeno y por la cepa, destacando *Enterococcus faecalis* LM24 como principal productor. Esta cepa sintetizó importantes cantidades de espermina, que se considera la poliamina más activa en la regulación de numerosos procesos fisiológicos. Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, las cepas estudiadas no implicarían riesgos derivados de la producción de aminas biógenas.
2. La producción de ácido linoleico conjugado obtenida en este trabajo se puede considerar interesante, en especial en el caso de *Lactobacillus gasseri* LM21. El principal isómero sintetizado por todas las cepas fue el *cis*-9, *trans*-11, aunque la producción de la isoforma *trans*-10, *cis*-12 fue significativa en algunos casos. *Enterococcus faecium* LM27 sintetizó cantidades relevantes de ácido linoleico conjugado extracelular, lo que podría resultar de interés para su producción *in situ* en el intestino.
3. El principal isómero del ácido láctico producido por todas las cepas, salvo *Lactobacillus gasseri* LM21, fue la isoforma L(+), independientemente del azúcar empleado como sustrato, por lo que su utilización como probióticos no implicaría riesgos toxicológicos.
4. El mayor productor de ácidos grasos de cadena corta fue *Enterococcus faecalis* LM24. Los principales ácidos sintetizados fueron acético, propiónico y, en menor medida, butírico. La producción de ácido acético por algunos lactobacilos superaría la obtenida en otras cepas de este mismo género. En cuanto a los enterococos, si bien la producción de ácido acético fue mayor, ésta se puede considerar moderada en comparación con los datos publicados por otros autores.
5. Todas las cepas presentaron una producción neta de folatos. Si bien es cierto que la técnica analítica empleada permitió la cuantificación de un mayor número de derivados y, por tanto, una producción total superior, las concentraciones en las que se detectaron los distintos derivados también fueron mayores que las señaladas por otros autores, y el perfil resultó ser específico de cepa. *Lactobacillus salivarius* HN6 y *Lactobacillus gasseri* LM21 sintetizaron mayoritariamente folato extracelular, lo que también podría ser de interés para su producción directa y absorción en el intestino.

6. La producción de oligosacáridos en general, y la de FOS en particular, fue baja, aunque será necesario profundizar en la caracterización de las actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de estos compuestos como futura herramienta para obtener los oligosacáridos más adecuados para el crecimiento de la microbiota intestinal.
7. Por la producción global de compuestos bioactivos se proponen las cepas *Lactobacillus salivarius* HN6 y *Enterococcus faecalis* LM24 para futuros estudios complementarios con el objetivo de comprobar su aptitud tecnológica. *Lactobacillus gasseri* LM21 y *Lactobacillus coryniformis* Q8 se propondrían para la producción específica de ácido linoleico conjugado y folatos, respectivamente.

1. Polyamine synthesis was influenced by oxygen tension and strain specificity; *Enterococcus faecalis* LM24 was the main producer. This strain synthesized significant amounts of spermine, which is the most active polyamine in the regulation of many physiological processes. From a safety viewpoint, the strains studied in this work would not involve any risk due to biogenic amine production.
2. Conjugated linoleic acid production by the selected strains could be considered of interest, especially that of *Lactobacillus gasseri* LM21. The main isomer synthesized by all the strains was cis-9, trans-11, although trans-10, cis-12 amounts were significant in some cases. *Enterococcus faecium* LM27 produced noticeable levels of extracellular conjugated linoleic acid, which would be useful for in situ synthesis in the gut.
3. L(+)-lactate was the main isomer produced in sugar fermentation, except for *Lactobacillus gasseri* LM21; therefore the use of the selected strains as probiotics would not involve any toxicological risk.
4. *Enterococcus faecalis* LM24 was the main producer of short-chain fatty acids. Acetate, propionate and, to a lesser extent, butyrate were the main acids synthesized by the selected strains. The production of acetate by some lactobacilli was higher than that reported in the literature for other strains of the same genus. Acetate production by enterococci was higher, but it can be considered as moderate in comparison with the data published by other authors.
5. All the strains showed a net folate production. Although the analytical technique used in this study permitted the quantification of a greater number of folate derivatives and, thus, a higher production, their concentrations were also higher than those reported in the literature, and the profile was strain specific. *Lactobacillus salivarius* HN6 and *Lactobacillus gasseri* LM21 mainly produced extracellular folate, which would also be interesting for direct synthesis and absorption in the large intestine.
6. The production of oligosaccharides, in particular fructo-oligosaccharides, was low. However, it will be necessary a further characterization of the enzymatic activities involved in oligosaccharide synthesis as a tool to obtain compounds

tailored towards a more specific utilization by the gut microbiota.

7. On the basis of the global production of bioactive compounds, *Lactobacillus salivarius* HN6 and *Enterococcus faecalis* LM24 strains are proposed for further studies aimed to assess their technological utility. *Lactobacillus gasseri* LM21 and *Lactobacillus coryniformis* Q8 would be of interest for the specific production of conjugated linoleic acid and folates, respectively.

## BIBLIOGRAFÍA





- Akolkar, S.K., Sajgure, A.D. y Lele, S.S. (2006).  $\beta$ -Galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* isolated from fermented ragi (*Eleusine coracana*). *Indian J. Biotechnol.* 5: 184-188.
- Alonso, L., Cuesta, E.P. y Gilliland, S.E. (2003). Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. *J. Dairy Sci.* 86: 1941-1946.
- Amado, M., Almeida, R., Schwientek, T. y Clausen, H. (1998). *Biochem. Biophys. Acta* 1473: 35-53.
- Ando, A., Ogawa, J., Kishino, S. y Shimizu, S. (2003). CLA production from ricinoleic acid by lactic acid bacteria. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80: 889-894.
- Arai, S. (1993). Physiological functions of foods. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Congress on Engineering and Food*, pp. 48-53, Chiba, Japan.
- Arcot, J. y Shrestha, A. (2005). Folate: method of analysis. *Trends Food Sci. Technol.* 16: 253-266.
- Ardeshirpour, L., Cole, D.E.C. y Carpenter, T.O. (2007). Evaluation of bone and mineral disorders. *Ped. Endocrinol. Rev.* 5: 584-98.
- Arena, M.E. y Manca de Nadra, M.C. (2001). Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *J. Appl. Microbiol.* 90: 158-162.
- Arena, M.E., Saguir, F.M. y Manca de Nadra, M.C. (1999a). Arginine dihydrolase pathway in *Lactobacillus plantarum* from orange. *Int. J. Food Microbiol.* 47: 203-209.
- Arena, M.E., Saguir, F.M. y Manca de Nadra, M.C. (1999b). Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. *Int. J. Food Microbiol.* 52: 155-161.
- Aro, A., Mannisto, S., Salminen, I., Ovaskainen, M.L., Kataja, V. y Uusitupa, M. (2000). Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutr. Cancer* 38: 151-157.
- Arsène-Ploetze, F. y Bringel, F. (2004). Role of inorganic carbon in lactic acid bacteria metabolism. *Lait* 84: 49-59.
- Bachrach, U. (2004). Polyamines and cancer: minireview article. *Amino Acids* 26: 307-309.
- Banni, S., Angioni, E., Contini, M., Carta, G., Casu, V., Lengo, G., Melis, P., Deiana, M., Dessi, A. y Corongiu, F. (1998). Conjugated linoleic acid and oxidative stress. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 261-267.
- Bardócz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 341-346.
- Bardócz, S., Duguid, T.J., Brown, D.S., Grant, G., Pusztai, A., White, A. y Ralph, A. (1995). The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *Brit. J. Nutr.* 73: 819-828.
- Baró, L., Jiménez, J.J., Martínez-Férez, A. y Boza, J.J. (2001). Bioactive compounds derived from human milk. *Ars Pharm.* 42: 21-38.
- Bello, J. (2006). La ciencia de los alimentos saludables: una panorámica actual. *Ars Pharm.* 47: 137-171.
- Bernalier, A., Dore, J. y Durand, M. (1999). Biochemistry of fermentation. En *Colonic microbiota, nutrition and health*. Gibson, G.R. y Roberfroid, M.B. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 37-53.
- Berrada, N., Lemeland, J.F., Laroche, G., Thouvenot, P. y Piaia, M. (1991). *Bifidobacterium* from fermented milks: Survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* 74: 409-413.

- Beylot, M. (2005). Effects of inuline-type fructans on lipid metabolism in man and animal models. *Br. J. Nutr.* 93: 163-168.
- Bielecka, M., Biedrzycka, E. y Majkowska, A. (2002). Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Res. Int.* 35: 25-131.
- Black, F., Einarsson, K., Lidbeck, A., Orrhage, K. y Nord, C.E. (1991). Effect of lactic acid producing bacteria on the human intestinal microflora during ampicillin treatment. *Scand. J. Infect. Dis.* 2: 247-254.
- Black, F.T., Andersen, P.L., Örsskov, J., Örskov, F., Gaarslev, K. y Laulund, S. (1989). Prophylactic efficacy of lactobacilli on travelers diarrhea. *Travel Med.* 7: 333-335.
- Blankson, H., Stakkestad, J.A., Erling, H.F., Wadstein, T.J. y Gudmundsen, O. (2000). Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *J. Nutr.* 130: 2943-2948.
- Boehm, G. y Stahl, B. (2007). Oligosaccharides from milk. *J. Nutr.* 137: 847-849.
- Bongaerts, G., Severijnen, R. y Timmerman, H. (2005). Effect of antibiotics, prebiotics and probiotics in treatment for hepatic encephalopathy. *Med. Hypotheses* 64: 64-68.
- Bourriaud, C., Robins, R.J., Martin, L., Kozlowski, F., Tenailleau, E., Cherbut, C. y Michel, C. (2005). Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *J. Appl. Microbiol.* 99: 201-212.
- Bover-Cid, S. y Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53: 33-41.
- Broker, L.E., Kruyt, F.A. y Giaccone, G. (2005). Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res.* 11: 3155-3162.
- Brouns, F. y Vermeer, C. (2000). Functional food ingredients for reducing the risks of osteoporosis. *Trends Food Sci. Technol.* 11: 22-33.
- Brouwer, I.A., van Dusseldorp, M., West, C.E., Meyboom, S., Thomas, C.M., Duran, M., van het Hof, K.H., Eskes, T.K., Hautvast, J.G. y Steegers-Theunissen, R.P. (1999). Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *J. Nutr.* 129: 1135-1139.
- Brussaard, J.H., M.R. Lowik, H. van den Berg, H.A. Brants, y R.A. Goldbohm. 1997. Folate intake and status among adults in the Netherlands. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51: 46-50.
- Bukowska, H., Pieczul-Mroz, J., Jastrzebska, M., Chelstowski, K. y Naruszewicz, M. (1998). Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. *Atherosclerosis* 137: 437-438.
- Burton, G.W. (1989). Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutr.* 119: 109-111.
- Buts, J.P., De Keyser, N., De Raedemaeker, L., Collette, E. y Sokal, E.M. (1995). Polyamine profiles in human milk, infant artificial formulas, and semi-elemental diets. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 21: 44-49.
- Calvaresi, E y Bryan, J. (2001). B vitamins, cognition, and aging: a review. *J. Gerontol. B. Psychol. Sci. Soc. Sci.* 56: 327-339.
- Camilo, E., Zimmerman, J., Mason, J.B., Golner, B., Russell, R., Selhub, J. y Rosenberg, I.H. (1996). Folate synthesized by bacteria in the human

- upper small intestine is assimilated by the host. *Gastroenterol.* 110: 991-998.
- Cammack, R. (1969). Assay, purification and properties of mammalian D-2-hydroxy acid dehydrogenase. *Biochem. J.* 115: 55-64.
- Capano, G., Bloch, K.J., Carter, E.A., Dascoli, J.A., Schoenfeld, D. y Harmatz, P.R. (1998). Polyamines in human and rat milk influence intestinal cell growth in vitro *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 27: 281-286.
- Casti, A., Bernasconi, S., Orlandini, G., Reali, N., Zannino, L. y Bacciottini, F. (1985). Pattern of human blood spermidine and spermine in prematurity. *Clin. Chim. Acta* 147: 223-232.
- Casti, A., Orlandini, G., Reali, N., Bacciottini, F., Vanelli, M. y Bernasconi, S. (1982). Pattern of blood polyamines in healthy subjects from infancy to the adult age. *J. Endocrinol. Invest.* 5: 263-266.
- Castle, W.B. (1978). Megaloblastic anemia. *Postgrad. Med.* 64: 117-122.
- Clifford, A.J., Heid, M.K., Peerson, J.M. y Bills, N.D. (1991). Bioavailability of food folates and evaluation of food matrix effects with a rat bioassay. *J. Nutr.* 121: 445-453.
- Clouet, P., Demizieux, L., Gresti, J. y Degrace, P. (1998). Mitochondrial respiration on rumenic and linoleic acids. *Biochem. Soc. Trans.* 29: 320-325.
- CODEX (2011). Codex alimentarius. Norma para preparados para lactantes y preparados para usos medicinales especiales destinados a los lactantes. CODEX STAN 72-1981, Revisión 2011.
- Collado, M.C., Meriluoto, J. y Salminen, S. (2007). In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Res. Int.* 40: 629-636.
- Collomb, M., Schmid, A., Sieber, R., Wechslera, D. y Ryhanen, E.L. (2006). Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *Int. Dairy J.* 16: 1347-1361.
- Comisión Europea (1996). Reglamento (CE) 1924/2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos
- Comisión Europea (1997). Reglamento (CE) 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios.
- Commane, D.M., Shortt, C.T., Silvi, S., Cresci, A., Hughes R.M. y Rowland, I.R. (2005). Effects of fermentation products of pro- and prebiotics on trans-epithelial electrical resistance in an *in vitro* model of the colon. *Nutr. Cancer* 51: 102-109.
- Connolly, E. y Lönnerdal, B. (2004). D(-)-lactic acid-producing bacteria safe to use in infant formulas. *NUTRAfoods* 3: 37-49.
- Coppa, G.V., Bruni, S., Morelli, L., Soldi, S. y Gabrielli, O. (2004). The first prebiotics in humans. Human milk oligosaccharides. *J. Clin. Gastroenterol.* 38: 80-83.
- Coppedè, F., Tannorella, P., Pezzini, I., Migheli, F., Ricci, G., Caldarazzo, E., Piaceri, I., Polini, A., Nacmias, B., Monzani, F., Sorbi, S., Siciliano, G. y Migliore, L. (2012). Folate, homocysteine, vitamin B12, and polymorphisms of genes participating in one-carbon metabolism in late-onset Alzheimer's disease patients and healthy controls. *Antioxidants & Redox Signaling* 17: 195-204.
- Coppen, A. y Bolander-Gouaille, C. (2005) Treatment of depression: time to consider folic acid and vitamin B12. *J. Psychopharmacol.* 19: 59-65.
- Corral, J.M. (2005). Clonación, expresión y evolución dirigida de beta-galactosidasas de procariotas. Tesis

- Doctoral. Universidad de Granada.
- Corthésy, B., Gaskins, H.R. y Mercenier, A. (2007). Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J. Nutr.* 137: 781-790.
- Crider, K.S., Bailey, L.B. y Berry, R.J. (2011). Folic acid food fortification. Its history, effect, concerns, and future directions. *Nutr.* 3: 370-384.
- Crittenden, R.G. (1999). Prebiotics. En *Probiotics: a critical review*. Tannock, G.W. (ed.). Horizon Scientific Press, Norfolk, pp.141-156.
- Crittenden, R.G. y Payne, M.J. (1996). Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 353-361.
- Crittenden, R.G., Martinez, N.R. y Playne, M.J. (2003). Synthesis and utilization of folate by yogurt starter cultures and probiotic bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 80: 217-222.
- Cross, M.L. (2002). Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 34: 245-253.
- Cruz, R., D'Arcadia-Cruz, V., Belote, J.G., de Oliveira-Khenayfes, Dorta, C., dos Santos-Oliveira, L.H., Ardiles, E. y Galli, A. (1999). Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. *Biores. Technol.* 70: 165-171.
- Cummings, J.H. y Macfarlane G.T. (1997). Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clin. Nutr.* 16: 3-11.
- Cummings, J.H. y Macfarlane, G.T. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon – a review. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 443-459.
- Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P.E. y MacFarlane, G.T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28: 1221-1227.
- Cunningham, D.C., Harrison, L.Y. y Shultz, T.D. (1997). Proliferative responses of normal human mammary and MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid, conjugated linoleic acid and eicosanoid synthesis inhibitors in culture. *Anticancer Res.* 17: 197-203.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. y Collins, J.K. (1998). Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *Int. J. Dairy Technol.* 51: 123-136.
- Chatterjee, A., Yasmin, T., Bagchi, D. y Stohs, S.J. (2003). The bactericidal effects of *Lactobacillus acidophilus*, garcinol and Protykin compared to clarithromycin, on *Helicobacter pylori*. *Mol. Cell. Biochem.* 243: 29-35.
- Cheeson (1993). Probiotics and other intestinal mediators. En *Principles of Pig Science*. Cole, D.J.A., Wiseman, J. y Varley, M.A. (eds.). Nottingham University Press, Loughborough, pp. 197-214.
- Chen, C.C., y Walker, W.A. (2005). Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states. *Adv. Ped.* 52: 77-113.
- Chen, Z.Y., Chan, P.T., Kwan, K.Y. y Zhan, A. (1997). Reassessment of the antioxidant activity of conjugated linoleic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 749-753.
- Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L. y Pariza, M.W. (1992). Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Comp. Anal.* 5: 185-97.
- Choi, K.H., Namkung, H. y Paik, I.K. (1994). Effects of dietary fructooligosaccharides on suppression of intestinal colonization of *Salmonella*

- typhimurium* in broiler chickens. *Korean J. Anim. Sci.* 36: 271-284.
- Christen, W.G., Ajani, U.A., Glynn, R.J. y Hennekens, C.H. (2000). Blood levels of homocysteine and increased risks of cardiovascular disease: causal or casual? *Arch. Intern. Med.* 160: 422-434.
- Christiansen, J.K., Hughes, J.E., Welker, D.L., Rodríguez, B.T., Steele, J.L. y Broadbent, J.R. (2008). Phenotypic and genotypic analysis of amino acid auxotrophy in *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 416-423.
- Dandriofosse, G., Peulen, O., El Khefif, N., Deloyer, P., Dandriofosse, A.C. y Grandfils, Ch. (2000). Are milk polyamines preventive agents against food allergy? *Proc. Nutr. Soc.* 59: 81-86.
- Das, R. y Kanungo, M.S. (1982). Activity and modulation of ornithine decarboxylase and concentration of polyamines in various tissues of rats as a function of age. *Exp. Gerontol.* 17: 95-103.
- De Keersmaecker, S.C.J., Verhoeven, T.L.A., Desair, J., Marchal, K., Vanderleyden, J. y Nagy, I. (2006). Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 259: 89-96.
- De Man, J.D., Rogosa, M. y Sharpe M.E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bact.* 23: 130-135.
- De Vuyst, L., Makras, L., Avonts, L., Holo, H., Yi, Q., Servin, A., Fayol-Messaoudi, D., Berger, C., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Sgouras, D., Martinez-Gonzales, B., Panayotopoulou, E., Mentis, A., Smarandache, D., Savu, L., Thonart, P. y Nes, I. (2004). Antimicrobial potential of probiotic or potentially probiotic lactic acid bacteria, the first results of the International European Research Project PROPATH of the PROEUHEALTH Cluster. *Microb. Ecol. Health Dis.* 16: 125-130.
- Delargy, H.J., O'Sullivan, K.R., Fletcher, R.J. y Blundell, J.E. (1997). Effects of amount and type of dietary fiber (soluble and insoluble) on short term control of appetite. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 48: 67-77.
- Delgado, S. y Mayo, B. (2004). Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 90: 309-319.
- Deloyer, P., Dandriofosse, G., Bartholomeus, C., Romain, M., Klimek, M., Salmon, J., Gerard, P y Goessens, G. (1996). Polyamine and intestinal properties in adult rats. *Brit. J. Nutr.* 76: 627-637.
- Demigné, C., Morand, C., Levrat, M.A., Besson, C., Moundras, C. y Rémésy, C. (1995). Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Br. J. Nutr.* 74: 209-219.
- Desai, A.R., Powell, I.B. y Shah, N.P. (2004). Survival and activity of probiotic lactobacilli in skim milk containing prebiotics. *J. Food Sci.* 69: 57-60.
- Devery, R, Miller, A. y Stanton, C. (2001). Conjugated linoleic acid and oxidative behaviour in cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* 29: 341-344.
- Di Sabatino, A., Morera, R., Ciccocioppo, R., Cazzola, P., Gotti, S., Tinozzi, F.P., Tinozzi, S. y Corazza, G.R. (2005). Oral butyrate for mildly to moderately active Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22: 789-794.
- Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Borner, F., Fern, E.B. y Roberfroid, M.B. (1999). Scientific concepts in functional foods in Europe: consensus document.

- Brit. J. Nutr.* 81: 1-27.
- Droese, W. y Stolley, H. (1962). Funktionelle Prüfungen von säuglingsnahrungen; dargestellt an der säuremilchernährung junger säuglinge. *Dtsch. Med. J.* 13: 107-112.
- Droese, W. y Stolley, H. (1965). Die wirkung von milchsäure (D/L), citronsäure und protien auf die organischen säuren im harn von gesunden säuglingen im 1. Lebensvierteljahr. En *Symp über die Ernährung der Frühgeborenen, Bad Schachen, Mai 1964*. Karger Basel/Nueva York, pp. 63-72.
- Dufour, C., Dandrifosse, G., Forget, P., Vermesse, F., Romain, N. y Lepoint, P. (1988). Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rats. *Gastroenterol.* 95: 112-116.
- ECCR (2000). European Commission Community Research Project Report: *Functional Food Science in Europe*. vol. 1 and 2; Scientific concepts on *Functional Food Science in Europe*, vol. 3. EUR-18591. Luxemburgo: Office for Official Publications of the European Communities, L-2985.
- EFSA (2004). EFSA Scientific colloquium summary report QPS. Qualified Presumption of Safety of micro-organisms in food and feed. 13-14 December 2004, Brussels, Belgium.
- EFSA (2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA Journal* 587: 1-16.
- EFSA (2012). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2012 update). *EFSA Journal* 10 (12)3020.
- Elotmani, F., Revol-Junelles, A.M., Assobhei, O. y Millière, J.B. (2002). Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Lactococcus lactis* strains isolated from Raib, a Moroccan traditional fermented milk. *Curr. Microbiol.* 44: 10-17.
- Englyst, H.M., Hay, S. y Macfarlane, G.T. (1987). Polysaccharyde breakdown by mixed population of human faecal bacteria. *Microbiol. Ecol.* 95: 163-171.
- Ewaschuk, J.B., Naylor, J.M., Zello, G.A. (2005). D-lactate in human and ruminant metabolism. *J. Nutr.* 135: 1619-25.
- Ewaschuk, J.B., Walker, J.W., Diaz, H. y Madsen, K.L. (2006). Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs *in vitro* and *in vivo* in mice. *J. Nutr.* 136: 1483-1488.
- FAO (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. *Estudio FAO alimentación y nutrición* 85.
- Farriol, M., Segovia, T., Venereo, Y. y Orta, X. (1999). Importancia de las poliaminas: revisión de la literatura. *Nutr. Hosp.* 14: 101-113.
- Felley, C.P., Cortesy-Theulaz, I., Rivero, J.L., Sipponen, P., Kaufmann, M., Bauerfeind, P., Wiesel, P.H., Brassart, D., Pfeifer, A., Blum, A.L. y Michetti, P. (2001). Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13: 25-29.
- Ferguson, L.R., Chavan, R.R. y Harris, P.J. (2001). Changing concepts of dietary fiber: implications for carcinogenesis. *Nutr. Cancer* 39: 155-169.
- Ferrer, S., Landete, J.M., Polo, L. y Pardo, I. (2007). Las bacterias y su repercusión sobre las aminos biógenas. *International Symposium Microbiology and Food Safety of Wine*, Villafranca del Penedés, pp. 1-10.

- Finglas, P.M. y Wright, A.J.A. (2002). Folate bioavailability and health. *Phytochemistry Rev.* 1: 189-198.
- Fioramonti, J., Fargeas, M.J., Bertrand, V., Pradayrol, L. y Bueno L. (1994). Induction of postprandial intestinal motility and release of cholecystokinin by polyamines in rats. *Am. J. Physiol.* 267: 960-965.
- Fishman, S.M., Christian, P. y West, K.P. (2000). The role of vitamins in the prevention and control of anemia. *Public Health Nutr.* 3: 125-150.
- Fontecha, J. (2003). Los prebióticos en los alimentos: origen y efectos sobre el organismo humano. En *Nuevos alimentos para nuevas necesidades*. Servicio de promoción de la salud, Consejería de Sanidad, Madrid, pp.71-80.
- Fox, P.F., Law, J., McSweeney, P.L.H. y Wallace, J. (1993). Biochemistry of cheese ripening. En *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol. 1. *General aspects*. P.F. Fox (ed.). Elsevier Applied Science, Barking, pp. 389-438.
- Franceschin, M., Lombardo, C.M., Pascucci, E., D'Ambrosio, D., Micheli, E., Bianco, A., Ortaggi, G. y Savino, M. (2008). The number and distances of positive charges of polyamine side chains in a series of perylene diimides significantly influence their ability to induce G-quadruplex structures and inhibit human telomerase. *Bioorg. Med. Chem.* 16: 2292-2304.
- Fushimi, T. y Sato, Y. (2005). Effect of acetic acid feeding on the circadian changes in glycogen and metabolites of glucose and lipid in liver and skeletal muscle of rats. *Br. J. Nutr.* 94: 714-719.
- Gale, E.F. (1946). The bacterial amino acid decarboxylases. En *Advances in enzymology*, vol. 6. Nord, F.F. (ed.). Interscience Publishers, Nueva York.
- Gänzle, M.G., Zhang, C., Monang, B.S., Lee, V. y Schwab, C. (2009). Novel metabolites from cereal-associated lactobacilli – Novel functionalities for cereal products? *Food Microbiol.* 26: 712-719.
- Gardiner, C., Stanton, C., Lynch, P.B., Collins, J.K., Fitzgerald, G. y Ross, R.P. (2005). Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *J Dairy Sci.* 82: 1379-1387.
- Gawehn, K. (1984). D-(-)-Lactate. En *Methods of enzymatic analysis*. Bermeyer, H.U. (ed.). Verlag Chemie, Weinheim, pp. 588-592.
- Gibson, G.R. (1996). An overview of the composition and activities of the human colonic microbiota. En *Proceedings of COST Action 92 Workshop*, Espoo, Finland, 1995. Mäkki, Y. y Cummings, J.H. (eds.). Office of official publications of the European Communities, 11.23, Luxemburgo.
- Gibson, G.R. y Fuller, R. (2000). Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *J. Nutr.* 130: 391-394.
- Gibson, G.R. y Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401-1412.
- Goñi, I. y Gudiel-Urbano, M. (2001). Adición de oligosacáridos a las fórmulas para lactantes: prebióticos naturales. *Alimentaria* 321: 77-81.
- Granato, D., Branco, G.F., Nazzaro, F., Cruz, A.G. y Faria, J.A.F. (2010). Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety* 9: 292-302.
- Green, J.C., Nichols, B.P. y Matthews, R.G. (1996). Folate biosynthesis,



- reduction, and polyglutamylation. En *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Neidhardt, F.C. (ed.). ASM Press, Washington, vol. 1, pp. 665-673.
- Greenwald, P., Clifford, C.K. y Milner, J.A. (2001). Diet and cancer prevention. *Eur. J. Cancer*, 37: 948-965.
- Gregory, J.F. (2001). Case study: folate bioavailability. *J. Nutr.* 131: 1376-1382.
- Griinari, J.M. y Bauman, D.E. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. En *Advances in conjugated linoleic acid research*. Yurawez P., Mossoba M.M., Kramer J.K.G., Nelson G. y Pariza M.W. (eds.). American Oil Chemists Society, AOCS Press, Champaign, vol. 1, pp. 180-200.
- Guandalini, S., Pensabene, L., Zikri, M.A., Dias, J.A., Casali, L.G., Hoekstra, H., Kolacek, S., Massar, K., Micetic-Turk, D., Papadopoulou, A., de Sousa, J.S., Sandhu, B., Szajewska, H. y Weizman, Z. (2000). *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J. Ped. Gastroenterol. Nutr.* 30: 54-60.
- Guarner, F. y Malagelada, J.R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet* 360, 512-518.
- Guarner, F. y Schaafsma, G.J. (1998). Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 39, 237-238.
- Gupta, P., Andrew, H., Kirschner, B.S. y Guandalini, S. (2000). Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J. Ped. Gastroenterol. Nutr.* 31: 453-457.
- Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M. y Testoni, P.A. (2000). *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Digestive Dis. Sci.* 45: 1462-1464.
- Hague, A., Manning, A.M., Hanlon, K.A., Huschtcha, L.I., Hart, D. y Pareskeva, C. (1995). Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumor cell lines in a p53-independent pathway. Implications for the possible role of dietary fiber in the prevention of large-lowel cancer. *Int. J. Cancer* 55: 448-453.
- Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.* 5: 42-49.
- Hamana, K., Akiba, T., Uchino, F. y Matsuzaki, S. (1989). Distribution of spermine in bacilli and lactic acid bacteria. *Can. J. Microbiol.* 35: 450-455.
- Hammes, W.P., Weiss, N. y Holzapfel, W. (1992). En *The prokaryotes*. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. y Schleifer, K.H. (eds.). Springer, Nueva York.
- Hanson, S.W.F. y Olley, J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenate. *Biochem. J.* 89: 101-102.
- Heinemann, T., Kullabak-Ublick, A, Pietruck, B y von Bergmann, K. (1991). Mechanism of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 20: 59-63.
- Henning, S.J. (1981). Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *Am. J. Physiol.* 241:199-214.
- Hernández, L., Arrieta, J., Menéndez, C., Vázquez, R., Coego, A., Suárez, V., Selman, G., Petit-Glatron, M. y Chambert, R. (1995). Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem. J.* 309: 113-118.
- Heyer, A.G. y Wendenduerg, R. (2001). Gene cloning and functional

- characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowii* IAM 2544. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 363-370.
- Hoet, P.H. y Nemery, B. (2000). Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyamine-linked pathological or toxicological conditions. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 278: 417-433.
- Hoffpauer, D.W. y Bonnette, R.E. (1998). Enrichment update on folic acid. *Cereal Food Word* 4: 365-367.
- Hoier, E. (1992). Use of probiotic starter cultures in dairy products. *Food Austr.* 44: 418-420.
- Honda, H., Kataoka, F., Nagaoka, S., Kawai, Y., Kitazawa, H., Itoh, H., Kimura, K., Taketomo, N., Yamazaki, Y., Tateno, Y. y Saito, T. (2007). Beta-galactosidase, phospho-beta-galactosidase and phospho-beta-glucosidase activities in lactobacilli strains isolated from human faeces. *Lett. Appl. Microbiol.* 45: 461-466.
- Hooper, L.V., Xu, J., Falk, P.G., Midtvedt, T. y Gordon, J.I. (1999). A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9833-9838.
- Hove, H. (1998). Lactate and short chain fatty acid production in the human colon: implications for D-lactic acidosis, short bowel syndrome, antibiotic-associated diarrhoea, colon cancer and inflammatory bowel disease. *Dan. Med. Bull.* 45: 15-33.
- Hove, H., Nordgaard-Andersen, I. y Mortensen, P.B. (1994). Effect of lactic acid bacteria on the intestinal production of lactate and short-chain fatty acids, and the absorption of lactose. *Am. J. Clin. Nutr.* 59: 74-79.
- Hove, H. y Mortensen, P.B. (1995). Colonic lactate metabolism and D-lactic acidosis. *Dig. Dis. Sci.* 40: 320-30.
- Howarth, N.C., Saltzman, E. y Roberts, S.B. (2001). Dietary fiber and weight regulation. *Nutr. Rev.* 59: 129-39.
- Hsieh, H.P., Muller, J.G. y Burrows, C.J. (1994). Structural effects in novel steroidal polyamine-DNA binding. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 12077-12078.
- Hsu, C.A., Yu, R.C. y Chou, C.C. (2005). Production of  $\beta$ -galactosidase by bifidobacteria as influenced by various culture conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 197-206.
- Huang, H.Y., Caballero, B., Chang, S., Alberg, A., Semba, R., Schneyer, C., Wilson, R.F., Cheng, T.Y., Prokopowicz, G., Barnes, G.J. Vassy, J. y Bass, E.B. (2006). Multivitamin/mineral supplements and prevention of chronic disease. Evidence Reports/Technology Assessments, No. 139. *Agency for Healthcare Research and Quality (US)*, Rockville, Report 06-E012.
- Hughenoltz, J. y Smid, E.J. (2002). Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 497-507.
- Hung, M.N. y Lee, B.H. (1998). Cloning and expression of  $\beta$ -galactosidase gene from *Bifidobacterium infantis* into *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 20: 659-662.
- Huskisson, E., Maggini, S. y Ruf, M. (2007). The role of vitamins and minerals in energy metabolism and well-being. *J. Int. Med. Res.* 35: 277-289.
- Ibrahim, S.A. y O'Sullivan, D.J. (2000). Use of chemical mutagenesis for the isolation of food grade beta-galactosidase overproducing mutants of bifidobacteria, lactobacilli and *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.* 83: 923-930.
- Innocente, N., Moret, S., Corradini, C. y

- Conte, L.S. (2000). A rapid method for the quantitative determination of short-chain free volatile fatty acids from cheese. *J. Agric. Food Chem.* 48: 3321-3323.
- Ip, C. y Scimeca, J.A. (1997). Conjugated linoleic acid and linoleic acid are distinctive modulators of mammary carcinogenesis. *Nutr. Cancer* 27: 131-135.
- Ip, C., Singh, M., Thompson, H.J. y Scimeca, J.A. (1994). Conjugated linoleic acid suppressed mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res.* 54: 1212-1215.
- Isolauri, E., Rautava, S., Kalliomaki, M., Kirjavainen, P. y Salminen, S. (2002). Role of probiotics in food hypersensitivity. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2: 263-271.
- Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H. y Salminen, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 444-450.
- Iynkaran, N. y Yadav, M. (1987). Food allergy. En *Food allergy. Immunopathology of the small intestine*. Marsch, M.N. (ed.). John Wiley and Sons, Nueva York, pp. 415-449.
- Jaattela, M. (2004) Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 23: 2746-2756.
- Jacobs, H.M. y Christian, J.R. (1957). Observations on full-term newborn infants receiving an acidified milk formula. *Lancet* 77: 157-159.
- Jägerstad, M., Piironen, V., Walker, C., Ros, G., Carnovale, E., Holasova, M. y Nau, H. (2005). Increasing natural food folates through bioprocessing and biotechnology. *Trends Food Sci. Technol.* 16: 298-306.
- Jiang, J., Björck, L. y Fonden, R. (1998). Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *J. Appl. Microbiol.* 85: 95-102.
- Jiang, T. y Savaiano, D.A. (1997). *In vitro* lactose fermentation by human colonic bacteria is modified by *Lactobacillus acidophilus* supplementation. *J. Nutr.* 127: 1489-1495.
- Johnson, L.R., Brockway, P.D., Madsen, K., Hardin, J.A. y Gall, D.G. (1995). Polyamines alter intestinal glucose transport. *Am. J. Physiol.* 268: 416-423.
- Joosten, H.M.L.J. y Northold, M.D. (1989) Detection, growth and amine producing capacity of lactobacilli in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2356-2359.
- Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S. y Arvilommi, H. (1992). Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Ped. Res.* 32: 141-144.
- Kailasapathy, K. y Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol. Cell Biol.* 78: 80-88.
- Kalač, P. y Krausová, P. (2005). A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chem.* 90: 219-230.
- Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P y Isolauri E (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357: 1076-1079.
- Kamlage, B., Hartmann, L., Gruhl, B. y Blaut, M. (2000). Linoleic acid conjugation by human intestinal microorganisms is inhibited by glucose and other substrates *in vitro* and in gnotobiotic rats. *J. Nutr.* 130: 2036-2039.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria.

- Antonie van Leeuwenhoek 49: 209-224.
- Kang, H.K., Seo, M.Y., Seo, E.S., Kim, D., Chung, S.Y., Kimura, A., Day, D.F. y Robyt, J.F. (2005). Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1727: 5-15.
- Kang, J.X. y Leaf, A. (2000). Prevention of fatal cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 202-207.
- Kaplan, B.J., Crawford, S.G., Field, C.J. y Simpson, J.S. (2007). Vitamins, minerals, and mood. *Psychol. Bull.* 133:747-60.
- Kaur, I.P., Chopra, K. y Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15: 1-9.
- Kecskes, G., Belagyi, T. y Olah, A. (2003). Early jejunal nutrition with combined pre- and probiotics in acute pancreatitis - prospective, randomized, double-blind investigations. *Magy. Seb.* 56: 3-8.
- Kelly, G.S. (2001). Conjugated linoleic acid. *Alter. Med. Rev.* 6: 367-382.
- Kim, B.W., Choi, J.W. y Yun, J.W. (1998). Selective production of GF<sub>4</sub> fructooligosaccharide from sucrose by a new transfructosylating enzyme. *Biotechnol. Lett.* 20: 1031-1034.
- Kim, S.H., Lim, K.P. y Kim, H.S. (1997). Differences in the hydrolysis of lactose and other substrates by b-D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *J. Dairy Sci.* 80: 2264-2269.
- Kim, Y.J. (2003). Partial inhibition of biohydrogenation of linoleic acid can increase the conjugated linoleic acid production of *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4258-4262.
- Kimura, M., Danno, K. y Yasui, H. (2006). Immunomodulatory function and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Mongolian fermented milk. *Biosci. Microflora* 25: 147-155.
- Kishino, S., Ogawa, J., Omura, Y., Matsumura, K. y Shimizu, S. (2002). Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *JAOCS* 79: 159-163.
- Klaver, F.A. y Van der Meer, R. (1993). The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1120-1124.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Seppinen, R., Pukkala, E. y Aromaa, A. (1996). Intake of dairy products and the risk of breast cancer. *Br. J. Cancer* 73: 687-691.
- Kok, R.M., Smith, D.E.C., Dainty, J.R., van den Akker, J.T., Finglas, P.M., Smulders, Y.M., Jakobs, C. y de Meera, K. (2004). 5-Methyltetrahydrofolic acid and folic acid measured in plasma with liquid chromatography tandem mass spectrometry: applications to folate absorption and metabolism. *Anal. Biochem.* 326: 129-138.
- Kongo, J.M., Ho, A.J., Malcata, F.X. y Wiedmann, M. (2007). Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from São Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods. *J. Appl. Microbiol.* 103: 1838-1844.
- Konings, E.J., Roomans, H.H., Dorant, E., Goldbohm, R.A., Saris, W.H. y van den Brandt, P.A. (2001). Folate intake of the Dutch population according to newly established liquid chromatography data for foods. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 765-776.
- Kopp-Hoolihan, L. (2001). Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J. Am. Diet. Assoc.* 101: 229-241.
- Korakli, M., Pavlovic, M., Ganzle, M.G. y

- Vogel, R.F. (2003). Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2073-2079.
- Koury, M.J. y Ponka, P. (2004). New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron. *Annu. Rev. Nutr.* 24: 105-131.
- Kramer, J.K.G., Fellner, V., Dugan, M.E.R., Sauer, F.D., Mossoba, M.M. y Yurawecz, M.P. (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total *trans* fatty acids. *Lipids* 32: 1219-1228.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B. y Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int. Dairy J.* 13: 3-13.
- Kunji, E.R.S., Mierau, I., Hagfing, A., Poolman, B. y Konings, W.N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 187-221.
- Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N. y Strobel, S. (2000). Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.* 20: 699-722.
- Kunz, C. y Rudloff, S. (2008). Potential anti-inflammatory and anti-infectious effects of human milk oligosaccharides. *Adv. Exp. Med. Biol.* 606: 455-465.
- Lamoureux, L., Roy, D. y Gauthier, S.F. (2002). Production of oligosaccharides in yogurt containing bifidobacteria and yogurt cultures. *J. Dairy Sci.* 85: 1058-1069.
- Landete, J.M., Rivas, B., Marcobal, A. y Muñoz, R. (2007). Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *Int. J. Food Microbiol.* 117: 258-269.
- Larqué, E., Sabater-Molina, M., y Zamora, S. (2007). Biological significance of dietary polyamines. *Nutr.* 23: 87-95.
- Leahy, M., Vaughan, P., Fanning, L., Fanning, S. y Sheehan, D. (2001). Purification and some characteristics of a recombinant dimeric *Rhizobium meliloti* beta-galactosidase expressed in *Escherichia coli*. *Enz. Microbial Technol.* 28: 682-688.
- Lee, K., Paek, K., Lee, H.Y., Park, J.H. y Lee Y. (2007). Antiobesity effect of trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillus plantarum* PL62 on diet-induced obese mice. *J. Appl. Microbiol.* 103: 1140-1146.
- Lee, K.N., Kritchevsky, D. y Pariza, M.W. (1994). Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108: 19-25.
- Lee, S.O., Hong, G.W. y Oh, D.K. (2003a). Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid by immobilized *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnol. Prog.* 19: 1081-1084.
- Lee, S.O., Kim, C.S., Cho, S.K., Choi, H.J., Ji, G.E. y Oh, D.K. (2003b). Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid during fermentation and by washed cells of *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnology Letters*, 25: 935-938.
- Leuschner, R.G., Heidel, M. y Hammes, W.P. (1998a). Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 39: 1-10.
- Leuschner, R.G.K., Kurihara, R. y Hammes, W. P. (1998b). Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 44: 15-20.
- Leuschner, R.G.K., Kurihara, R. y Hammes, W. P. (1999). Formation of biogenic amines by proteolytic enterococci during cheese ripening. *J. Sci. Food Agric.* 79: 1141-1144.

- Levri, K.M., Ketvertis, K., Deramo, M., Merenstein, J.H. y D'Amico, F. (2005). Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. *J. Fam. Pract.* 54: 613-20.
- Lichtenstein, A.H. (1997). Trans fatty acids, plasma lipid levels, and risk of developing cardiovascular disease. A statement for health professionals from American Heart Association. *Circulation* 95: 2588-2590.
- Lichtenstein, A.H. (1998). Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. *J. Nutr.* 128: 1589-1592.
- Lilly, D. M. y Stillwell, R. H. 1965. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147: 747-748.
- Lin, M.Y. y Young, C.M. (2000). Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 10: 409-413.
- Lin, T.Y. (2000). Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and additives. *Food Chem.* 69: 27-31.
- Lin, Y., Kreeft, A., Schuurbijs, J.A. y Draijer, R. (2001). Different effects of conjugated linoleic acid isomers on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocyte. *Nutr. Biochem.* 12: 183-189.
- Linsalata, M., Russo, F., Berloco, P., Valentini, A.M., Caruso, M.L., Simone, C., Barone, M., Polimeno, L. y Di Leo, A. (2005). Effects of probiotic bacteria (VSL#3) on the polyamine biosynthesis and cell proliferation of normal colonic mucosa of rats. *In Vivo* 19: 989-996.
- Lodinova-Zadnikova, R., Cukrowska, B. y Tlaskalova-Hagenova, H. (2003). Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years). *Int. Arch. Allergy Immunol.* 131: 209-211.
- Löser, C. (2000). Polyamines in human and animal milk. *Brit. J. Nutr.* 84: 55-58.
- Löser, C., Eisel, A. y Fölsch, U.R. (1999). Dietary polyamines are essential luminal growth factors for small intestinal and colonic mucosal growth and development. *Gut*, 44: 12-16.
- Lucas, A., Sodini, I., Monnet, C., Jolivet, P. y Corrieu, G. (2004). Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. *Int. Dairy J.* 14: 47-53.
- Lucock M. (2000). Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology and role in disease processes. *Mol. Genet. Metab.* 71: 121-138.
- MacDonald, H.B. (2000). Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge. *J. Am. Coll. Nutr.* 19: 111-118.
- Macfarlane S. y Macfarlane G.T. (1995). Proteolysis and amino acid fermentation. En *Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology*. Gibson, G.R. y Macfarlane, G.T. (eds.), CRC Press, Boca Raton, pp. 75-100.
- Macfarlane, S., Macfarlane, G.T. y Cummings, J.H. (2006). Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24: 701-714.
- Macfarlane, G.T., Steed, H. y Macfarlane, S. (2008). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J. Appl. Microbiol.* 104: 305-344.
- Macfarlane, S. y Macfarlane, G.T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* 62: 67-72.
- Mack, D.R. (2004). D(-)-lactic acid-producing probiotics, D(-)-lactic acidosis and infants. *Can. J. Gastroenterol.* 18: 671-675.
- Mack, D.R., Michail, S. y Wet, S. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol.* 276: 941-950.

- Maggiore, M., Bologna, M., Cerù, M.P., Possati, L., Angelucci, A., Cimini, A., Miglietta, A., Bozzo, F., Margiotta, C., Muzio, G. y Canuto, R.A. (2004). An overview of the effect of linoleic and conjugated-linoleic acids on the growth of several human tumor cell lines. *Int. J. Cancer* 112: 909-919.
- Mahoney, R.R. (2003).  $\beta$ -Galactosidase. En *Handbook of food enzymology*. Whitaker, J.R., Vorage, A.G. y Wong, D.W.S. (eds.). Marcel Dekker, Nueva York, pp. 823-828.
- Maiorano, A.E., Moniz-Piccoli, R., Sabino da Silva, E. y Andrade-Rodrigues, M.F. (2008). Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of prebiotics. *Biotechnol. Lett.* 30: 1867-1877.
- Majamaa, H. e Isolauri, E. (1997). Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99: 179-186.
- Mäkiyuokko, H.A., Saarinen, M.T., Ouwehand, A.C. y Rautonen, N.E. (2006). Effects of lactose on colon microbial community structure and function in a four-stage semi-continuous culture system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 2056-2063.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R. y Huis in't Veld, J.H. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J Dairy Sci.* 80: 1031-1037.
- Martín, R., Jiménez, E., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J. y Rodríguez, J.M. (2006). *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *Int. J. Food Microbiol.* 112: 35-43.
- Martín, R., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J. y Rodríguez, J.M. (2005a). Probiotic potential of 3 *Lactobacilli* strains isolated from breast milk. *J Hum. Lact.* 21: 8-17.
- Martín, R., Olivares, M., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L. y Rodríguez, J.M. (2005b). Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 267-277.
- Martínez, A. (2004). Obtención de oligosacáridos de leche de diferentes especies por tecnología de membranas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Massaro, M., Carluccio, M.A. y de Caterina, R. (1999). Direct vascular antiatherogenic effects of oleic acid: a clue to the cardioprotective effects of the Mediterranean diet. *Cardiologia* 44: 507-513.
- Mataix Verdú, J., Quiles Morales, J.L. y Rodríguez Huertas, J. (2001). Aceites y grasas. En *Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC). Guías alimentarias para la población española*. IM & C, Madrid, pp. 121-131.
- Mataix, J. (2009). En *Nutrición y alimentación humana*. Ergón, Madrid.
- Matricardi, P.M., Bjorksten, B., Bousquet, J., Djukanovic, R., Dreborg, S., Gereda, J., Malling, H.J., Popov, T., Raz, E. y Renz, H. (2003). Microbial products in allergy prevention and therapy. *Allergy* 58: 461-471.
- Matsumoto, M. y Benno, Y. (2004). Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutat. Res.* 568: 147-153.
- Mattila-Sandholm, T., Blum, S., Collins, J.K., Crittenden, R., de Vos, W., Dunne, C., Fondén, R., Grenov, G., Isolauri, E., Kiely, B., Marteau, P., Morelli, L., Ouwehand, A., Reniero, R., Saarela, M., Salminen, S., Saxelin, M., Schiffrin,

- E., Shanahan, F., Vaughan, E. y von Wright, A. (1999). Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 393-399.
- Mattila-Sandholm, T. y Saarela, M. (2003). En *Functional dairy products*. Woodhead Publishing, Cambridge.
- Mazza, G. (2000). *Functional foods: biochemical and processing aspects*. Technomic Publishing Company, Pensilvania.
- McKenna, L. y McIntyre, M. (2006). What over-the-counter preparations are pregnant women taking? A literature review. *J. Adv. Nurs.* 56: 636-45.
- McVeagh, P. y Miller, J.B. (1997). Human milk oligosaccharides: only the breast. *J. Paediatr. Child Health* 33: 281-286.
- Mehra, R. y Kelly, P. (2006). Milk oligosaccharides: Structural and technological aspects. *Int. Dairy J.* 16: 1334-1340.
- Mei, Y.H. (1994). A sensitive and fast method for the determination of polyamines in biological samples. Benzoyl chloride pre-column derivatization high-performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 17: 2413-2418.
- Meier, R., Burri, E. y Steuerwald, M. (2003). The role of nutrition in diarrhea syndrome. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 6: 563-567.
- Melse-Boonstra, A., West, C.E., Katan, M.B., Kok, F.J. y Verhoef, P. (2004). Bioavailability of heptaglutamyl relative to monoglutamyl folic acid in healthy adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 424-429.
- Mercenier, A., Pavan, S. y Pot, B. (2002). Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr. Pharm. Design* 8: 99-110.
- Merk, K., Borelli, C. y Korting, H.C. (2005). Lactobacilli – bacteria–host interactions with special regard to the urogenital tract. *Int. J. Medical Microbiol.* 295: 9-18.
- Messina, M. y Hughes, C. (2003). Efficacy of soy foods and soybean isoflavone supplements for alleviating menopausal symptoms is positively related to initial hot flush frequency. *J. Med. Food* 6: 1-11.
- Messina, M.J. (1999). Legumes and soybeans: overview of its nutritional profile and health effects. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 439-450.
- Messina, M.J., Persky, V., Setchell, K.D.R. y Barnes, S. (1994). Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr. Cancer* 21: 113-131.
- Metchnikoff, E. (1907). En *The prolongation of life*. William Heinemann, Londres.
- Moinard, C., Cynober, L. y De Bandt, J.P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin. Nutr.* 24: 184-197.
- Mollet, B. (1999). Genetically improved starter strains: opportunities for the dairy industry. *Int. Dairy J.* 9: 11-15.
- Molloy, A.M. (2002). Folate bioavailability and health. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 72: 46-52.
- Molloy, A.M. y Scott, J.M. (2001). Folate and prevention of disease. *Public Health Nutr.* 4: 601-609.
- Mónar, J. (2007). The Spanish functional food market: present and future perspectives. *Functional FoodNet (FFNet) network meeting*, IATA-CSIC.
- Montanari, G., Zambonelli, C., Grazia, L., Benevelli, M. y Chiavari, C. (2000). Release of  $\beta$ -galactosidase from Lactobacilli. *Food Technol. Biotechnol.* 38: 129-133.
- Morales-Arrieta, S., Rodríguez, M.E., Segovia, L., López-Munguía, A. y Olvera-Carranza, C. (2006).



- Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene* 376: 59–67.
- Moreno, R. (2000). Fibra dietética. En *Nutrición y dietética para tecnólogos de los alimentos*. Díaz de Santos, Madrid, pp. 41-48.
- Moreno-Arribas, V., Torlois, S., Joyeux, A., Bertrand, A. y Lonvaud-Funel, A. (2000) Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. *J. Appl. Microbiol.* 88: 584-593.
- Munday, J.S., Thompson, K.G. y James, K.A. (1999). Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Brit. J. Nutr.* 81: 251-255.
- Nagao, F., Nakayama, M., Muto, T. y Okumura, K. (2000) Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the immune system in healthy human subjects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 2706-2708.
- Nakaya, R. (1984). Role of bifidobacterium in enteric infection. *Bifidobacteria Microflora* 3: 3-9.
- Nakayama, T. y Amachi, T. (1999).  $\beta$ -Galactosidase, enzymology. En *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. Flickinger, M.C. y Drew, S.W. (eds.). John Wiley and Sons, Nueva York, vol. 3, pp. 1291-1305.
- Newburg, D.S. (2000). Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30: 8-17.
- Nguyen, T.H., Splechtna, B., Steinbock, M., Kneifel, W., Lettner, H.P., Kulbe, K.D. y Haltrich, D. (2006). Purification and characterization of two novel  $\beta$ -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 4989-4998.
- Nicolosi, R.J., Rogers, E.J., Kritchevsky, D., Scimeca, J.A. y Huth, P.J. (1997). Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoprotein and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery* 22: 266-277.
- Niedzielin, K., Kordecki, H. y Birkenfeld, B. (2001). A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299v in patients with irritable bowel syndrome. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13: 1143-1147.
- Niittynen, L., Kajander, K. y Korpela, R. (2007). Galacto-oligosaccharides and bowel function. *Scand. J. Food Nutr.* 51: 62-66.
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn D.E., Boelens P.G., van Norren K. y van Leeuwen, PA. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74: 418-25.
- Nilforooshan, R., Broadbent, D., Weaving, G., Gurton, J., Moore, V., Houston, L. y Tabet, N. (2011). Homocysteine in Alzheimer's disease: role of dietary folate, vitamin B6 and B12. *Int. J. Geriatr. Psych.* 26: 876-877.
- Niness, K.R. (1999). Inulin and Oligofructose: What are they? *J. Nutr.* 129: 1402-1406.
- Noack, J., Klessen, B., Proll, J., Dongowski, G. y Blaut, M. (1998). Dietary guar gum and pectin stimulate intestinal microbial polyamine synthesis in rats. *J. Nutr.* 128: 1385-1391.
- Nobaek, S., Johansson, M.L., Molin, G., Ahrne, S. y Jeppsson, B. (2000). Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 1231-1238.
- Nout, M.J.R., Rombouts, F.M. y Havelaar, A. (1989). Effect of accelerated natural

- lactic fermentation of infant food ingredients on some pathogenic microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 8: 351-361.
- O'Quinn, P.R., Nelssen, J.L., Goodband, R.D. y Tokach, M.D. (2000). Conjugated linoleic acid. *Anim. Health Res. Rev.* 1: 35-46.
- Oberman, H. y Libudzisz, Z. (1998). Fermented milks. En *Microbiology of fermented foods*. Wood, B.J.B. (ed.). Blackie Academic and Professional, Londres, pp. 308-350.
- Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K. y Shimizu, S. (2005). Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 100: 355-364.
- Oh, D.K., Hong, G.H., Lee, Y., Min, S., Sin, H.S. y Cho, S.K. (2003). Production of conjugated linoleic acid by isolated *Bifidobacterium* strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 907-912.
- Okamoto, A., Sugi, E., Koizumi, Y., Yanagida, F. y Udaka, S. (1997). Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 1582-1584.
- Okamura, N., Nakaya, R., Yokota, H., Yama, N. y Kariashima, T. (1986). Interaction of *Shigella* and *Bifidobacteria*. *Bifidobacteria Microflora* 5: 51-55.
- Olah, A., Belagyi, T., Issekutz, A., Gamal, M.E. y Bengmark, S. (2002). Randomized clinical trial of specific lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* 89: 1103-1107.
- Olivares-Illana, V., Wachter-Odarte, C., Le Borgne, S. y López-Munguía, A. (2002). Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: a *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. *J. Ind. Microb. Biotechnol.* 28: 112-117.
- Ouwehand, A.C. y Salminen, S.J. (1998). The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int. Dairy J.* 8: 749-758.
- Pariza, M.W. (2004). Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin Nutr.* 79: 1132-1136.
- Pariza, M.W., Park, Y. y Cook, M.E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid Res.* 40: 283-298.
- Park, Y. y Pariza, M.W. (2007). Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). *Food Res. Int.* 40: 311-323.
- Parodi, P.W. (1994). Conjugated linoleic acid content: An anticarcinogenic fatty acid present in milk fat. *Austr. J. Dairy Technol.* 49: 93-97.
- Parodi, P.W. (1999). Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat, *J. Dairy Sci.* 82: 1339-1349.
- Passos, L.M.L. y Park, Y.K. (2003). Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. *Ciência Rural* 33: 385-390.
- Patring, J.D.M. y Jastrebova, J.A. (2007). Application of liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry for determination of dietary folates: Effects of buffer nature and mobile phase composition on sensitivity and selectivity. *J. Chromatogr. A* 1143: 72-82.
- Pelicano, E.R.L., Souza, P.A. y Souza, H.B.A. (2002). Prebiotics and probiotics in poultry nutrition. *Ciê. Agr. Saúde* 2: 59-64.
- Perdigón, G. y Holgado, A.P.R. (2000). Mechanisms involved in the

- immunostimulation by lactic acid bacteria. En *Probiotics 3: immunomodulation by the gut microflora and probiotics*. Fuller, R. y Perdigón, G. (eds.). Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 213-233.
- Pérez Chaia, A. y Zárate, G. (2005). Dairy propionibacteria from milk or cheese diets remain viable and enhance propionic acid production in the mouse cecum. *Lait* 85: 85-98.
- Pestana, J.M., Costa, A.S.H., Martins, S.V., Alfaia, C.M., Alves, S.P., Lopes, P.A., Bessa, R.J.B. y Prates, J.A.M. (2012). Effect of slaughter season and muscle type on the fatty acid composition, including conjugated linoleic acid isomers, and nutritional value of intramuscular fat in organic beef. *J. Sci. Food Agric.* 92: 2428-2435.
- Peters, G.J., Hooijberg, J.H., Kaspers, G.J.L. y Jansen, G. (2005). Folate and antifolates in the treatment of cancer, role of folic acid supplementation on efficacy of folate and non-folate drugs. *Trends Food Sci. Technol.* 16: 289-297.
- Peulen, O., Deloyer, P. y Dandrifosse, G. (2004a). Short-term effects of spermine ingestion on the small intestine: a comparison of suckling and weaned rats. *Reprod. Nutr. Dev.* 44: 353-364.
- Peulen, O., Gharbi, M., Powroznik, B. y Dandrifosse G. (2004b). Differential effect of dietary spermine on alkaline phosphatase activity in jejunum and ileum of unweaned rats. *Biochimie* 86: 487-493.
- Pompei, A., Cordisco, L., Amaretti, A., Zaroni, S., Matteuzzi, D. y Rossi, M. (2007). Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 179-185.
- Porro, D., Bianchi, M.M., Brambilla, L., Menghini, R., Bolzani, D., Carrera, V., Lievense, J., Liu, C.L., Ranzi, B.M., Frontali, L. y Alberghina, L. (1999). Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4211-4215.
- Potier de Courci, G. (2006). Le point sur le rôle des folates. Le point sur le rôle des folates. *Sci. Aliment.* 26: 363-376.
- Puebla, A.F., Battaglia, M.E., Salerno, G.L. y Pontis, H.G. (1999). Sucrose-sucrose fructosyl transferase activity: a direct and rapid colorimetric procedure for the assay in plant extracts. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 699-702.
- Quera, R., Quigley, E.M.M. y Madrid, A.M. (2005). Sobrecrecimiento bacteriano Intestinal. *Rev. Med. Chile* 133: 1361-1370.
- Quinlivan, E.P., Hanson, A.D. y Gregory, J.F. (2006). The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples. *Anal. Biochem.* 348: 163-184.
- Rahman, S.M., Wang, Y.M., Yotsumoto, H., Cha, J.Y., Han, S.Y., Inoue, S. y Yanagita, T. (2001). Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and beta-oxidation of fatty acid in OLETF Rats. *Nutr.* 17: 385-390.
- Recsei, P.A., Moore, W.M. y Snell, E.E. (1985). Pyruvoyl-dependent histidine decarboxylases from *Clostridium perfringens* and *Lactobacillus buchneri*. *J. Biol. Chem.* 258: 439-444.
- Renner, E. (1987). Nutritional aspects of cheese. En *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol. 1. *General aspects*. P.F. Fox (ed.). Elsevier Applied Science, Barking, pp. 345-363.
- Reuter, G. (2001). The lactobacillus and bifidobacterium microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2: 43-53.
- Rodrigues, L., Rocha, I. y Torres, D. (2005). Alimentos funcionais - uma área estratégica para a BIOTEMPO. *Bol. Biotecnol.* 82: 3-12.

- Rodríguez-Alcalá, L.M., Braga, T., Malcata, F.X., Gomes, A. y Fontecha, J. (2011). Quantitative and qualitative determination of CLA produced by *Bifidobacterium* and lactic acid bacteria by combining spectrophotometric and Ag+-HPLC techniques. *Food Chem.* 125: 1373-1378.
- Rolfe, R.D. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* 130: 396-402.
- Roller, M., Rechkemmer, G. y Watzl, B. (2004). Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. *J. Nutr.* 134: 153-156.
- Rooss, K., Hakansson, E.G. y Holm, S. (2001). Effect of recolonisation with "interfering" streptococci on recurrences of acute and secretory otitis media in children: randomised placebo controlled trial. *Brit. Med. Assoc.* 322: 1-4.
- Ros, E. (2001). *Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC). Guías alimentarias para la población española*. IM & C, Madrid.
- Roy, C.C., Kien, C.L., Bouthillier, L. y Levy, E. (2006). Short-chain fatty acids: ready for prime time?. *Nutr. Clin. Pract.* 21: 351-66.
- Rusell, D.H. y McVicker, T.A. (1972). Polyamine biogenesis in the rat mammary gland during pregnancy and lactation. *Biochem. J.* 130: 71-76.
- Saad, S.M.I. (2006). Probiotics and prebiotics: the state of the art. *Braz. J. Pharm. Sci.* 42: 1-16.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Matto, J. y Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84: 197-215.
- Saavedra, J.M., Bauman, N.A., Oung, I., Perman, J.A. y Yolken, R.H. (1994). Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet*, 344: 1046-1049.
- Sakata, T. (1987). Stimulatory effect of short chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for the trophic effects of fermentable fiber, gut microbes and luminal trophic effects. *Brit. J. Nutr.* 58: 95-103.
- Sakata, T., Kojima, T., Fujieda, M., Takahashi, M. y Michibata, T. (2003). *P. Nutr. Soc.* 62: 73-80.
- Salminen, S.P., Gueimonde, M. y Isolauri, E. (2005). Probiotics that modify disease risk. *J. Nutr.* 135: 1294-1298.
- Salyers, A.A. (1984). *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* 38: 293-313.
- Salyers, A.A. y Leedle, J.A.Z. (1983). Carbohydrate utilization in the human colon. En *Human intestinal microflora in health and disease*. Hentges, D.J. (ed.). Academic Press, Londres, pp. 129-146.
- Sánchez-Muñiz, F.J. (2002). Importancia de la calidad y cantidad de grasa en la dieta. *Eurocarne* 107: 83-96.
- Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N. y Prapulla, S.G. (2005). Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends Food Sci. Tech.* 16: 442-454.
- Santik, H.P., Hessels, J., Kingma, A.W., VandenBerg, G.A., Muskiet, F.A. y Halie, M.R. (1989). Microbial influences on urinary polyamines excretion. *Clin. Chim. Acta* 179: 305-314.
- Santosa, S., Farnworth, E. y Jones, P.J.H. (2006). Probiotics and their potential health claims. *Nutr. Rev.* 64: 265-274.
- Sakata, T. (1987). Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a

- possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *Br. J. Nutr.* 58: 95-103.
- Scalabrino, G. y Ferioli, M.E. (1984). Polyamines in mammalian ageing: an oncological problem, too? A review. *Mech. Ageing Dev.* 26: 149-164.
- SCF, (2003). Report of the Scientific Committee on Food on the revision of essential requirements of infant formulae and follow-on formulae. SCF/CS/NUT/IF/ 65 Final.
- Scheppach, W., Bartram, H.P. y Richter, F. (1995) Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 31: 1077-1080.
- Scherezmeir, J. y De Vrese, M. (2001). Probiotic, prebiotics and synbiotics approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 361-364.
- Schmid, A., Collomb, M., Sieber, R. y Bee, G. (2006). Conjugated linoleic acid in meat and meat products: a review. *Meat Sci.* 73: 29-41.
- Schneider, J.A., Rees, D.C., Liu, Y-T. y Clegg, J.B. (1998) Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 1258-1260.
- Schroeder, V.A., Michalek, S.M. y Macrina, F.L. (1989). Biochemical characterization and evaluation of virulence of a fructosyltransferase-deficient mutant of *Streptococcus mutans* V403. *Infect. Immun.* 57: 3560-3569.
- Schwab, C. y Gänzle, C.M.G. (2006). Effect of membrane lateral pressure on the expression of fructosyltransferases in *Lactobacillus reuteri*. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 89-99.
- Sébédio, J.L., Gnaedig, S. y Chardigny, J.M. (1999). Recent advances in conjugated linoleic acid research. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2: 499-506.
- Seiler, N. (1990). Polyamine metabolism. *Digestion* 46: 319-330.
- Selhub, J. (2002). Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism. *J. Nutr. Health Aging* 6: 39-42.
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T. y Korpela, R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 326-330.
- Shornikova, A.V., Casas, I., Mykkänen, H., Salo, E. y Vesikari, T. (1997). Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *Ped. Infect. Dis. J.* 16: 1103-1107.
- Shortt, C. (1999). The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 411-417.
- Shultz T.D., Chew B.P., Seaman W. y Leudecke L.O. (1992). Inhibitory effect of conjugated linoleic acid and beta-carotene on the *in vitro* growth of human cancer cells. *Cancer Lett.* 63: 125-133.
- Silla Santos, M.H. (1998). Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 39: 227-230.
- Simon, E., Macarulla, M.T., Fernandez-Quintela, A., Rodriguez, V.M. y Portillo M.P. (2005). Body fat-lowering effect of conjugated linoleic acid is not due to increased lipolysis. *J. Physiol. Biochem.* 61: 363-369.
- Simopoulos, A.P. (2004). Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food Rev. Int.* 20: 77-90.
- Siró, I., Kapolna, E., Kapolna, B. y Lugasi, A. (2008). Functional food: product development, marketing and consumer acceptance. *Appetite*. 51: 456-467.

- Smith, D.E., Kok, R.M., Teerlink, T., Jakobs, C. y Smulders, Y.M. (2006). Quantitative determination of erythrocyte folate vitamers distribution by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44: 450-459.
- Smith, J.G., Yokoyama, W.H. y German, J.B. (1998). Butyric acid from the diet: Actions at the level of gene expression. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38: 259-297.
- Solga, S.F. (2003). Probiotics can treat hepatic encephalopathy. *Med. Hypotheses* 61: 307-313.
- Song, D.D. y Jacques, N.A. (1999). Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem. J.* 341: 285-291.
- Spiegel, J.E., Rose, R., Karabell, P., Frankos, V.H. y Schmitt, D.F. (1994). Safety and benefits of fructo-oligosaccharides as food ingredients. *Food Technol.* 48: 85-89.
- Splechna, B., Nguyen, T.H., Steinböck, M., Kulbe, K. D., Lorenz, W. y Haltrich, D. (2006). Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose using beta-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 4999-5006.
- Splechna, B., Nguyen, T.H., Zehetner, R., Lettner, H.P., Lorenz, W. y Haltrich, D. (2007). Process development for the production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose using  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus* spp. *Biotechnol. J.* 2: 480-485.
- Stanton, C., Desmond, C., Coakley, M., Collins, J.K., Fitzgerald, G. y Ross, R.P. (2003). Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. En *Handbook of fermented functional foods*. Farnworth, E.R., (ed.). CRC Press, Boca Raton, pp. 27-58.
- Stanton, C., Ross, P., Fitzgerald, G.F. y Van Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16: 198-203.
- Steck, S.E., Chalecki, A.M., Miller, P., Conway, J., Austin, G.L., Hardin, J.W., Albright, C.D. y Thuillier, P. (2007). Conjugated linoleic acid supplementation for twelve weeks increases lean body mass in obese humans. *J. Nutr.* 137: 1188-1193.
- Stiles, M.E. y Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.
- Stolz, P., Vogel, R.F. y Hammes, W.P. (1995). Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 201: 402-410.
- Stover, P. y Schirch, V. (1993). The metabolic role of leucovorin. *Trends Biochem. Sci.* 18: 102-106.
- Sugano, M., Tsujita, A., Yamasaki, M., Noguchi, M. y Yamada, K. (1998). Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediator and immune globulins in rats. *Lipids* 33: 521-527.
- Sugita, T. y Togawa, M. (1994). Efficacy of lactobacillus preparation Biolactis powder in children with rotavirus enteritis. *Jpn. J. Pediatr.* 47: 2755-2762.
- Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, M.H.N. y Hugenholtz, J. (2003). Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4542-4548.
- Sybesma, W.F.H. (2003). Metabolic engineering of folate production in lactic acid bacteria. Tesis Doctoral. Wageningen University, The Netherlands.
- Tabor, H. y Tabor, C.W. (1985). Polyamines in microorganisms.

- Microbiol. Rev.* 49: 81-99.
- Tamime, A.Y. (2005). *Probiotic dairy products*. Blackwell, Oxford.
- Taniguchi, M., Tokunaga, T., Horiuchi, K., Hoshino, K., Sakai, K. y Tanaka, T. (2004). Production of L-lactic acid from a mixture of xylose and glucose by co-cultivation of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 160-165.
- Tedelind, S., Westberg, F. Kjerrulf, M. y Vidal, A. (2007). Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 28: 2826-2832.
- Teixeira de Almeida, D., Santaolalia Ayora, M.L. y Alonso Iglesias, E. (2003). La arginina en su contexto metabólico y fisiológico. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 37: 165-179.
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M. y Huis in't Veld, J.H. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 11: 73-84.
- ter Steege, J.C.A., Buurman, W.A. y Forget, P.P. (1997). Spermine induces maturation of the immature intestinal immune system in neonatal mice. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 25: 332-340.
- Thornalley, P.J. (1990). The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* 269: 1-11.
- Tieking, M. y Gänzle, M.G. (2005). Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends Food Sci. Technol.* 16: 79-84.
- Tieking, M., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F. y Gänzle, M.G. (2005a). Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 655-663.
- Tieking, M., Kühnl, W. y Gänzle, M.G. (2005b). Evidence for formation of heterooligosaccharides by *Lactobacillus sanfranciscensis* during growth in wheat sourdough. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2456-2462.
- Til, H.P., Falke, H.E., Prinsen, M.K. y Willems, M.I. (1997). Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food Chem. Toxicol.* 35: 337-348.
- Tomlin, J. y Read, N.W. (1988). The relationship between bacterial degradation of viscous polysaccharides and stool output in human beings. *Brit. J. Nutr.* 60: 467-475.
- Topping, D.L. y Clifton, P.M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.* 81: 1031-1064.
- Toscani, A., Soprano, D.R. y Soprano, K.J. (1988). Molecular analysis of sodium butyrate growth arrest. *Oncogene Res.* 3: 223-238.
- Tryland, I. y Fiksdal, L. (1998). Enzyme characteristics of  $\beta$ -D-galactosidase- and  $\beta$ -D-glucuronidase-positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1018-1023.
- Tsukahara, T., Koyama, H., Okada, M. y Ushida, K. (2002). Stimulation of butyrate production by gluconic acid in batch culture of pig cecal digesta and identification of butyrate-producing bacteria. *J. Nutr.* 132: 2229-2234.
- Tubbs, P.K. (1965). The metabolism of D-a-hydroxy acids in animal tissues. *Ann. NY Acad. Sci.* 119: 920-926.
- Tzortzis, G., Goulas, A. y Gibson, G.R. (2005). Synthesis of prebiotic

- galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 412-416.
- Uda, K., Tsujikawa, T., Ihara, T., Fujiyama, Y. y Bamba, T. (2002). Luminal polyamines upregulate transmembrane glucose transport in the rat small intestine. *J Gastroenterol.* 37: 434-41.
- Ushiyama, A., Tanaka, K., Aiba, Y., Shiba, T., Takagi, A., Mine, T. y Koga, Y. (2003). *Lactobacillus gasseri* OLL2716 as a probiotic in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 18: 986-991.
- Valenzuela, A. y Mogardo, M. (1999). Trans fatty acid isomers in human health and in the food industry. *Biol. Res.* 32: 273-287.
- van den Broek, L.A.M., Hinz, S.W.A., Beldman, G., Vincken, J.P. y Voragen, A. G.J. (2008). Bifidobacterium carbohydrases – their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. *Mol. Nutr. Food Res.* 52: 146-163.
- van den Broek, L.A.M., Ton, J., Verdoes, J.C., Van Laere, K.M.J., Voragen, A.G.J. y Beldman, G. (1999). Synthesis of  $\beta$ -galacto-oligosaccharides by a cloned  $\beta$ -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis*. *Biotechnol. Lett.* 21: 441-445.
- Van Geel-Schutten, G.H., Flesch, F., ten Brink, B., Smith, M.R. y Dijkhuizen, L. (1998). Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 697-703.
- Van Hijum, S.A.F.T. (2004). Fructosyltransferases of *Lactobacillus reuteri*: Characterization of genes, enzymes, and fructan polymers. Tesis Doctoral. University of Groningen. The Netherlands
- Van Hijum, S.A.F.T., van Geel-Schutten, G.H., Rahaoui, H., Van der Maarel, M.J.E.C. y Dijkhuizen, L. (2002). Characterisation of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4390-4398.
- Van Loo, J., Clune, Y., Bennett, M. y Collins, J.K. (2005). The SYNCAN project: goals, set-up, first results and settings of the human intervention study. *Br. J. Nutr.* 93: 91-98.
- Van Loo, J., Coussement, P., DeLeenheer, L., Hoebregs, H. y Smits, G. (1995). On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 525-552.
- Varela Moreiras, G., González, M.P. y Alonso-Aperte, E. (2005). Impaired methionine and folate metabolism in colorectal carcinogenesis. *Trends Food Sci. Technol.* 16: 282-288.
- Vasiljevic, T. y Jelen, P. (2003). Oligosaccharide production and proteolysis during lactose-hydrolysis using crude cellular extracts from lactic acid bacteria. *Lait* 83: 453-467.
- Vassu, T., Smarandache, D., Stoica, I., Sasarman, E., Fologea, D., Musat, F., Csutak, O., Nohit, A.M., Iftime, O. y Gherasim, R. (2001). Biochemical and genetic characterization of *Lactobacillus plantarum* CMGB-1 strain used as probiotic. *Roum. Biotechnol. Lett.* 7: 585-598.
- Velázquez-Hernández, M.L., Baizábal-Aguirre, V.M., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, M.P. y Valdez-Alarcón, J.J. (2009). Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *J. Appl. Microbiol.* 106: 1763-1778.
- Velicer, C.M. y Ulrich, C.M. (2008). Vitamin and mineral supplement use among US adults after cancer diagnosis: a systematic review. *J. Clin. Oncol.* 26:



- 665-73.
- Vergio, F. (1954). Anti- und probiotika. *Hipocrates* 25: 116-119.
- Verhaar, M.C., Stroes, E. y Rabelink, T.J. (2002). Folate and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 6-13.
- Visonneau, S., Cesano, A., Tepper, S.A., Scimeca, J.A., Santoli, D. y Kritchevsky, D. (1997). Conjugated linoleic Acid suppresses the growth of human breast adenocarcinoma cells in SCID Mice. *Anticancer Res.* 17: 969-973.
- Walker, W.A. y Dai, D. (1999). Protective nutrients for the immature gut. En *Nutrition of the very low birthweight infant*. Ziegler, E.E., Lucas, A. y Moro, G.E. (eds.). Nestlé nutrition workshop series. Nestec, Vevey y Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, vol. 43, pp: 179-197.
- Wang, M.F., Lin, H.C., Wang, Y.Y. y Hsu, C.H. (2004). Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatr. Allergy Immu.* 15: 152-158.
- Wong, J.M., de Souza, R., Kendall, C.W., Emam, A. y Jenkins, D.J. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Gastroenterol.* 40: 235-243.
- Wullt, M., Hagslätt, M.L. y Odenholt, I. (2003). *Lactobacillus plantarum* 299v for the treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a double-blind, placebo-controlled trial. *Scand. J. Infect. Dis.* 35: 365-367.
- Yamashita, K., Kawai, K. y Itakura, M. (1984). Effects of fructo-oligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. *Nutr. Res.* 4: 961-966.
- Yuan, Q., Ray, R.M., Viar, M.J. y Johnson, L.R. (2001). Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its antizyme in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280: 130-138.
- Yun, J.S., Wee, Y.J. y Ryu, H.W. (2003). Production of optically pure L(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enz. Microbial Technol.* 33: 416-423.
- Yurawecz, M.P., Roach, J.A., Sehat, N., Mossoba, M.M., Kramer, J.K., Fristsche, J., Steinhart, H. y Ku, K. (1998). A new conjugated linoleic acid isomers, 7 trans, 9 cis-octadecadienoic acid, in cow milk, cheese, beef and human milk and adipose tissue. *Lipids* 33: 803-809.
- Zavaglia, A., Kociubinski, G., Pérez, P. y De Antoni, G. (1998). Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. *J. Food Prot.* 61: 865-873.
- Zarzuelo Zurita, A. (2001). Fibra. En *Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC). Guías alimentarias para la población española*. IM & C, Madrid, pp. 277-287.
- Zhang, M., Caragine, T., Wang, H., Cohen, P.S., Botchkina, G., Soda, K., Bianchi, M., Ulrich, P., Cerami, A., Sherry, B. y Tracey, K.J. Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *JEM* 185: 1759-1768.
- Zhang, A. y Chen, Z.Y. (1997). Oxidative stability of conjugated linoleic acid relative to the other polyunsaturated fatty acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 1611-1613.